

论著·临床研究

脐血间充质干细胞经转染绿色荧光蛋白后治疗 SCID 小鼠烫伤的创面效应示踪

曲丽媛¹, 李梦文², 李振明¹, 潘希贵³, 王鑫^{1,2△}

(解放军第 970 医院/原解放军第 107 医院: 1. 输血科; 2. 中心实验室; 3. 创伤外科, 山东烟台 264002)

摘要: **目的** 利用该实验室先期已建成的人脐血源间充质干细胞株(FUCB-MSCs), 标记上增强型绿色荧光蛋白(EGFP), 以对烫伤 SCID 小鼠行外源性 FUCB-MSCs 移植治疗的创面区进行移植效应示踪。 **方法** FUCB-MSCs 经腺病毒转染标记 GFP; 建立深Ⅱ度烫伤 SCID 小鼠模型, 将小鼠随机分为低剂量移植组、高剂量移植组和空白对照组, 每组 6 只, 每只 2 个创面, 共 12 个创面, 分别将转染后的 GFP-MSCs 按照 0.2 mL 1×10^6 个、0.2 mL 2×10^6 个以及等体积培养基通过尾静脉注射的方式进行创面移植。移植 9 d 后取各组创面组织行冰冻切片 HE 染色, 比较各组创面面积和创面细胞数, 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达和创面修复损伤情况。 **结果** FUCB-MSCs 经逆转录病毒感染后, 48 h 荧光显微镜下可见到 EGFP 表达, 阳性率在 80% 以上, 且 6 周后仍能观察到 GFP 稳定表达, 移植后创面部位可观察到人源性 GFP 阳性表达, 移植 3 周后荧光未见衰减; 移植标记了 GFP 的 FUCB-MSCs 后 SCID 小鼠未出现排斥反应, 低剂量组、高剂量组与对照组比较, 在创面面积和细胞数上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 可提示尾静脉移植注射的 GFP-FUCB-MSCs 参与了创面愈合。 **结论** 利用 GFP 对人脐血源间充质干细胞移植治疗过程中的标记示踪, 表明烫伤后外源性 FUCB-MSCs 可通过 SCID 小鼠血液循环系统, 迁移聚集到烫伤创面持续参与修复。

关键词: 间充质干细胞; 移植; 绿色荧光蛋白; 荧光示踪

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.04.011

中图法分类号: R446.8

文章编号: 1673-4130(2019)04-0423-04

文献标识码: A

Fluorescence tracing of umbilical cord blood mesenchymal stem cells in transplantation treatment of scalded wound in mice

QU Liyuan¹, LI Mengwen², LI Zhenming¹, PAN Xigui³, WANG Xin^{1,2△}

(1. Department of Blood Transfusion, 2. Central Laboratory, 3. Trauma Surgery, PLA 107th Hospital, now is 970 Hospital of the PLA Joint Logistic Support Force, Yantai, Shandong 264002, China)

Abstract: **Objective** Using the previously established mesenchymal stem cells strain derived from human fetal umbilical cord blood (FUCB-MSCs) to culture then label enhanced green fluorescent protein (EGFP), and to observe skin repair effects of FUCB-MSCs by GFP tracing after exogenous FUCB-MSCs transplantation on to scald wound models of SCID mice. **Methods** FUCB-MSCs were labeled GFP by transfection with the recombinant retrovirus containing EGFP gen; The established SCID scald mice model were randomly divided into 3 groups, low dose group, high dose group and control group, 6 rats each group, 2 wounds each mouse, 12 wounds in total, then were tail intravenous injected into 0.2 mL 1×10^6 , 0.2 mL 2×10^6 GFP-FUCB-MSCs cells, and same volume of medium respectively. On 9 days after transplantation, the sections from scald wound area were observed the expression of GFP under the fluorescence microscope and the others were analyzed by the bright-field microscopy after HE staining, and the area of wound surface and the number of wound cells were compared simultaneously. **Results** After 48 h, expression of EGFP in FUCB-MSCs can be seen under the fluorescence microscope, positive rate of GFP was $> 80\%$, and after 6 weeks GFP expression is still stable, besides, the positive expression of human GFP can be observed after transplantation and there were no fluorescence decay in transplantation after 3 weeks. Compared with the control group, there was a significant difference in wound area and wound cell number in the low and high-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** GFP can be used as a tracking marker to label FUCB-MSCs during transplantation treatment. It indicates that exogenous FUCB-MSCs can migrate to the scalded wounds via blood circulation system and continuously participate in the repair through SCID mouse.

作者简介: 曲丽媛, 女, 主管技师, 主要从事血液检验与基础方向研究。 △ **通信作者,** E-mail: wang3j@gmail.com。

本文引用格式: 曲丽媛, 李梦文, 李振明, 等. 脐血间充质干细胞经转染绿色荧光蛋白后治疗 SCID 小鼠烫伤的创面效应示踪[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(4): 423-426.

Key words: mesenchymal stem cell; transplantation; enhanced green fluorescent protein(GFP); fluorescence tracing

近年来成体干细胞参与战(创)伤修复的规律及机制已成为军事医学领域研究热点,它的研究成果将有助于提高战(创)伤伤员救治效率和愈合质量^[1]。间充质干细胞有巨大的再生潜能,在组织工程和再生医学中起到重要的种子细胞作用。然而战(创)伤创面修复是一个复杂的过程,其中包括多种生长因子、细胞因子、化学因子和多种类型细胞的交互作用,目前仍不清楚战(创)伤创面修复过程中外源间充质干细胞作用的具体机制。本课题组基于本实验室前期已建成的脐血源间充质干细胞株(FUCB-MSCs)和其对深Ⅱ度烫伤创面移植修复能力的发现,尝试对FUCB-MSCs进行了绿色荧光蛋白(GFP)标记,对FUCB-MSCs参与修复的GFP效应示踪的可行性进行了探索,为进一步探究移植GFP-FUCB-MSCs参与SCID小鼠移植烫伤创面损伤修复过程中的迁移和聚集机制做好铺垫。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 脐血源间充质干细胞株FUCB-MSCs前期已由本室建成保存,仅用于实验室研究。动物实验符合《实验动物管理和使用指南》并报备。DMEM、胎牛血清等购自GIBCO;胰蛋白酶、EDTA等购自Sigma公司。逆转录病毒载体pLEGFP-N1、纯化pLEGFP-N1质粒、病毒包装细胞PT67、转染试剂Polybrene、G418(Geneticin)由仵敏娟博士惠赠。

1.2 实验方法

1.2.1 FUCB-MSCs的复苏培养与扩增 (1)将FUCB-MSCs细胞株从液氮中取出,放入到37℃水浴锅中,同时轻轻摇动,保证细胞能够在3 min内完全溶解;(2)用吸管将冻存管中细胞悬液吸到15 mL的含有培养液的离心管中,同时用培养液洗2次冻存管,一起加到离心管中吹匀;(3)1 000 r/min离心5 min,缓缓弃上清液,加入2~3 mL预热的完全培养基,轻轻吹匀,保证细胞完全重悬;(4)将重悬的细胞接种到T25培养瓶中,加入5 mL培养液,再把细胞摇均匀,放入37℃、饱和湿度、5% CO₂培养箱中;(5)次日换液,去除死细胞,以后每三天换液一次,倒置相差显微镜下观察细胞培养至80%融合度时,用0.25%胰酶(含0.02% EDTA)消化,按1:3传代扩增。

1.2.2 EGFP标记FUCB-MSCs (1)参照文献方法进行逆转录病毒的包装,将纯化pLEGFP-N1质粒,脂质体DOTAP介导转染PT67细胞,经G418筛选高感染率的抗性克隆进行传代;(2)细胞长满瓶底后,收集24 h培养液,孔径0.45 μm滤膜过滤,即为病毒液;(3)将FUCB-MSCs培养液移除,加入5 mL感染混合液(含1.5 mL病毒液,3.5 mL培养基,polybrene终浓度8 mg/L),37℃培养24 h;(4)加入7 mL

培养基,继续培养24 h后按1:3密度传代,用含200 mg/L G418的培养液杀死未转染成功的FUCB-MSCs,常规方法传代培养标记EGFP的克隆,即得标记EGFP的FUCB-MSCs。

1.2.3 SCID小鼠烫伤模型建立 免疫缺陷SCID纯系小鼠,雌雄不限,6~8周龄,体重18.229 g,SPF饲养,购自上海斯莱克实验动物中心。实验前1 d小鼠背部皮肤去毛,麻醉后,恒温恒压电烫仪背部造成直径1.5 cm的Ⅱ度烫伤创面。组织学观察烫伤1 d的小鼠皮肤全层组织细胞发生水肿,符合深Ⅱ度烫伤特点。

1.2.4 移植创面分组情况 将深Ⅱ度烫伤SCID小鼠随机分为低剂量移植组、高剂量移植组和空白对照组3组,每组6只,每只2个创面,共12个创面,分别将转染后的GFP-MSCs(1×10^6 个,0.2 mL)、MSCs(2×10^6 个,0.2 mL)、等体积培养基通过尾静脉注射的方式行细胞移植。烫伤后9 d统计各组创面面积和创面细胞数,面积测量方法按:用透明膜覆盖创面并沿创缘画膜,剪膜,置分度值为0.1 mg的天平称重换算成面积,细胞数量按HE染色光镜下计数所得。

1.2.5 标记细胞观察 术后9 d处死动物,立即取创面组织行冰冻切片、甘油封片,行荧光显微镜观察,荧光激发波长488 nm,发射波长507 nm。

1.2.6 组织学观察 取烫伤创面组织固定后,行石蜡切片、HE染色,光镜观察。

1.2.7 统计学方法 采用SPSS13.0统计软件包进行统计学方差分析及t检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 FUCB-MSCs的复苏与培养 经复苏后的FUCB-MSCs 24 h镜下观察到大量贴壁,呈分裂相均匀分散,2 d内呈相对静止状态,之后细胞生长速度加快,并呈克隆样生长,7 d左右呈漩涡状融合,细胞形态呈比较均一的梭形。见图1。

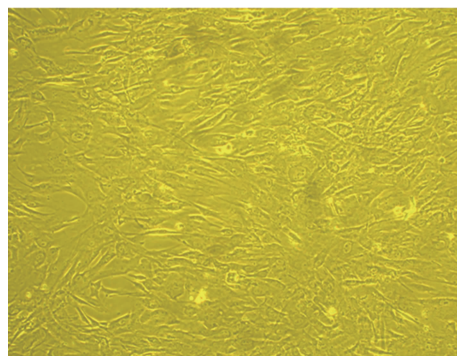


图1 复苏扩增FUCB-MSCs形态学观察(100×)

2.2 FUCB-MSCs体外标记EGFP pI EGFP-N1质粒转染PT67细胞后24 h观察到EGFP表达,FUCB-

MSCs 经逆转录病毒感染后,48 h 可见到 EGFP 表达,可见细胞转染效率为 7%,与未转染 FUCB-MSCs 形态无差异,4 周后 FUCB-MSCs 在倒置荧光显微镜下呈绿色、清晰的梭状,可见 GFP 的阳性率达 80% 以上,且荧光扩散至整个细胞,可反映细胞完整形态,见图 2。在培养液中存在 G418(300 mg/L)的条件下,标记 GFP 的 FUCB-MSCs 细胞在 4 个月的体外培养(由 P5 代开始传至 P20 代)可一直稳定表达 GFP。

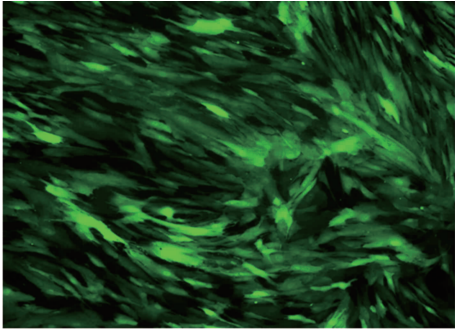


图 2 转染 GFP 后的 FUCB-MSCs 荧光显微镜观察(100×)

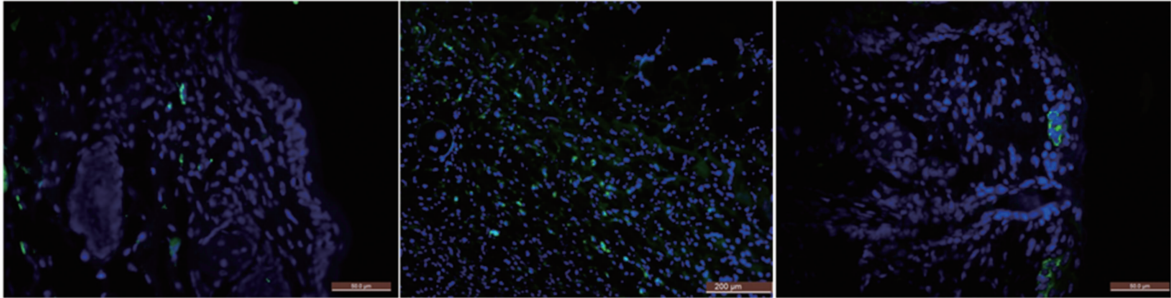
2.3 烫伤愈合恢复情况及创面细胞数对比 所有实验 SCID 小鼠实验前后均存活,生命状态正常,没有术后感染、化脓、体液渗出等不良反应。尾静脉移植后 5 d 开始,创面逐渐缩小,形成新生表皮。从移植后 9 d

的结果来看,低剂量组、高剂量组与对照组的创面面积和细胞数比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),提示尾静脉移植注射的 GFP-FUCB-MSCs 参与了创面愈合,见表 1。

表 1 各组创面面积及创面细胞数比较($\bar{x}\pm s$)			
	GFP-MSC 低剂量组	GFP-MSC 高剂量组	空白对照组
创面面积	0.245 8±0.023 9*	0.246 7±0.024 2*	0.401 6±0.031 8
创面细胞数	271.65±7.81#	273.48±8.73#	177.64±8.45

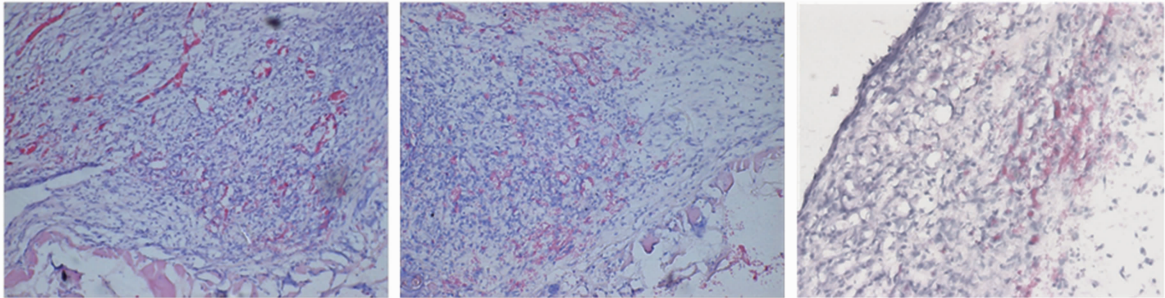
注:创面面积 与对照组相比,* $P<0.05$;创面细胞数 与对照组相比,# $P<0.05$

2.4 荧光与免疫组化结果 常规冰冻切片,DAPI 衬染,荧光显微镜下观察。荧光显微镜下观察,在肉芽组织中可见人源性绿色荧光蛋白 GFP 阳性表达。MSC 移植 9 d 后,创面可观察到绿色荧光,表皮真皮都有阳性信号出现,对照组未观察到阳性细胞,见图 3。9 d 后创面组织移植部位附近均可见 GFP 表达,荧光未见衰减。HE 染色显示,剂量组与对照组相比,实验组毛细血管、成纤维细胞、胶原纤维、网状纤维更多,排列较规则,阴性对照组也有出现,但量较少;不同剂量相比,尾静脉注射 2×10^6 个 FUCB-MSCs 较注射 1×10^6 个 FUCB-MSCs 创面愈合特征更加明显,见图 4。



注:从左至右依次为低剂量组、高剂量组和阴性对照组

图 3 移植后 9 d 皮肤肉芽组织荧光示踪观察结果



注:从左至右依次为低剂量组、高剂量组和阴性对照组

图 4 移植后 9 d 创面 HE 染色结果

3 讨 论

荧光蛋白标记技术是近年来迅速发展的一种细胞示踪技术,其具有易于检测、表达稳定、特异性强及可以实现活细胞观察、不影响细胞功能等优势。其原理是利用基因载体将荧光蛋白基因导入待标记细胞

中,通过筛选获得表达荧光蛋白的细胞,这些细胞可通过荧光显微镜直接观察,而不需反应底物^[2-3]。本课题组基于对 FUCB-MSCs 前期的研究成果^[4-5],对 FUCB-MSCs 进行了 EGFP 标记,对 FUCB-MSCs 效应示踪的可行性进行了探索,即:采用逆转录

病毒介导方法成功进行 EGFP 标记,使 EGFP 基因被整合入分裂期的 FUCB-MSCs 基因组中,发现通过体外培养 4 个月 GFP-FUCB-MSCs 亦能一直稳定表达而无明显减弱;进一步证实了 GFP 作为 FUCB-MSCs 参与移植烫伤创面损伤修复过程的有效标记示踪剂,可为细胞水平及体内移植细胞的研究提供实验手段。本课题组利用 EGFP 标记,表明烫伤后外源性 MSCs 可通过在 SCID 小鼠体内血液循环系统,迁移聚积到需要修复的烫伤创面组织区域,这也跟相关文献报道一致^[6-8]。

本课题组在前期的研究中发现尾静脉注射移植方法较局部患处直接移植方法的愈合效果欠佳,考虑到应该主要是移植剂量较少的原因,在本研究中通过提高尾静脉注射的细胞数量,从移植愈合效果来看也进一步确定了静脉途径给予 MSCs 的质量剂量层级。通过尾静脉注射移植,发现 GFP-FUCB-MSCs 可促进皮肤损伤修复并提高愈合质量,主要表现在经 FUCB-MSCs 治疗后创面肉芽组织中血管密度大,治疗组形成的新生表皮较厚,分层明显,这些结果与良好的修复质量密切相关,同时也进一步证明了 FUCB-MSCs 细胞经 GFP 标记后并未影响 MSCs 的修复潜能。

4 结 论

目前仅仅推测 GFP-FUCB-MSCs 参与烫伤创面修复而能迁移并聚集在创面部位系由炎症反应中趋化因子所致^[9-10]。下一步,本课题组将深入研究 FUCB-MSCs 参与烫伤创面修复的分子机制、在局部的增殖分化能力和表皮功能重建进行深入评价,以及 FUCB-MSCs 在创面造血重建过程中扮演的角色和所起的作用。

参考文献

[1] 程文广,黄正根,贺伟峰,等.应用人脐带血间充质干细胞

修复小鼠皮肤缺损创面[J].中华创伤杂志,2008,24(4):298-301.

[2] 段小军,杨柳,周跃,等.增强型绿色荧光蛋白标记技术对骨折后骨髓间充质干细胞的迁移示踪[J].中国修复重建外科杂志,2006,20(2):102-106.

[3] 曹慧玲,朱小飞,滕凤猛,等.GFP 作为脐带间充质干细胞体内示踪标志物在大鼠脑缺血再灌注损伤中的表达[J].国际检验医学杂志,2017,38(19):2688-2689.

[4] 史功,李先哲,李瑾,等.脐血源间充质干细胞移植对 SCID 小鼠烫伤创面修复的促进作用[J].实用医药杂志,2016,33(11):1004-1006.

[5] 曲丽媛,朱媛,李先哲,等.脐血间充质干细胞的分离培养及鉴定技术体系的建立[J].实用医药杂志,2017,34(8):729-730.

[6] WU M J, GUO X C, YANG L, et al. Mesenchymal stem cells with modification of junctional adhesion molecule a induce hair formation[J]. Stem Cells Transl Med, 2014, 3(4):481-488.

[7] 袁肇凯,黄献平,李勇华,等.养心通脉有效部位方动员骨髓间充质干细胞归巢大鼠梗死心肌的实验研究[J].中华中医药杂志,2012,27(9):2321-2325.

[8] 马俐君,胡晓霞,周虹,等.不同时相移植人骨髓间充质干细胞对人脐血 CD34⁺ 细胞植入 NOD/SCID 小鼠的影响[J].中国实验血液学杂志,2008,16(2):355-359.

[9] 郝牧,孟恒星,李刚,等.脐带间充质干细胞对 CD34⁺ 细胞在小鼠体内归巢的影响及其机制研究[J].中华血液学杂志,2009,30(2):103-106.

[10] 郝牧,漆佩静,李刚,等.人脐带间充质干细胞对脐血 CD34⁺ 细胞在 NOD/SCID 小鼠体内造血重建的影响[J].中国医学科学院学报,2010,32(1):71-75.

(收稿日期:2018-08-16 修回日期:2018-10-27)

(上接第 422 页)

[5] 茜金强,寿松涛.脓毒症患者血浆皮质醇水平的动态变化及临床意义[J].中国临床医学,2014,21(1):9-12.

[6] 付虎,周小平,刘星,等.降钙素原对脓毒症早期诊断价值的回顾性分析[J].国际检验医学杂志,2016,37(4):508-510.

[7] 李志军.脓毒症的诊断与治疗[J].中华劳动卫生职业病杂志,2009,27(11):700-702.

[8] CHO S Y, CHOI J H. Biomarkers of sepsis[J]. Infect Chemother, 2014, 46(1):1-12

[9] GOLD J R, COHEN N D, WELSH T H. Association of adrenocorticotrophin and cortisol concentrations with peripheral blood leukocyte cytokine gene expression in septic and nonseptic neonatal foals[J]. J Vet Intern Med, 2012, 26(3):654-661.

[10] FALCÃO GONÇALVES P, MENEZES FALCÃO L, DUQUE PINHEIRO I. Procalcitonin as biomarker of infection: implications for evaluation and treatment[J]. Am J Ther, 2017, 24(3):243-249.

[11] REN H, LI Y, HAN C, et al. Serum procalcitonin as a diagnostic biomarker for sepsis in burned patients: a meta-analysis[J]. Burns, 2015, 41(3):502-509.

[12] JIANG L, FENG B, GAO D, et al. Plasma concentrations of copeptin, C-reactive protein and procalcitonin are positively correlated with APACHE II scores in patients with sepsis[J]. J Int Med Res, 2015, 43(2):188-195.

[13] HOEBOER S H, VAN DER GEEST P J, NIEBOER D, et al. The diagnostic accuracy of procalcitonin for bacteraemia: a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Microbiol Infect, 2015, 21(5):474-481.

[14] 华罗刚,寿松涛.脓毒症患者心率变异性与甲状腺激素水平的关系[J].山东医药,2014,54(20):72-74.

[15] SEOANE L, PÉRTEGA S, GALEIRAS R, et al. Procalcitonin in the burn unit and the diagnosis of infection[J]. Burns, 2014, 40(2):223-229.

(收稿日期:2018-10-10 修回日期:2018-12-21)