

· 论 著 ·

# 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\*

曹慧玲, 朱小飞, 滕凤猛, 严士海, 李 全, 张春兵  
(南京中医药大学附属医院检验科, 南京 210029)

**摘要:**目的 通过腺病毒转染携绿色荧光蛋白(GFP)的脐带间充质干细胞(ucMSCs)移植大鼠脑缺血再灌注损伤模型, 研究 GFP 作为示踪剂的可行性。方法 体外培养经腺病毒转染 GFP 的 ucMSCs, 建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型, 通过脑立体定位技术将  $1 \times 10^6$  携 GFP 的 ucMSCs 移植入损伤脑组织, 并于造模 7 d 后取脑组织进行冰冻切片, 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况。结果 体外携 GFP 的 ucMSCs 形态呈成纤维状, 融合时聚集成簇, 呈放射状或漩涡状排列, 与未转染 ucMSCs 形态无差异, 荧光显微镜下可见 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。移植后大鼠未出现排斥反应, 7 d 后脑组织移植部位附近可见 GFP 表达, 荧光未见衰减。结论 GFP 作为 ucMSCs 移植治疗脑损伤的有效示踪剂, 可为细胞水平的各种研究及体内移植细胞的研究提供实验手段。

**关键词:**绿色荧光蛋白; 脑缺血再灌注; 脐带间充质干细胞; 示踪

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.19.012

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)19-2688-03

## Expression of GFP as a tracer marker of ucMSCs in cerebral ischemia-reperfusion injury rats\*

CAO Huiling, ZHU Xiaofei, TENG Fengmeng, YAN Shihai, LI Quan, ZHANG Chunbing

(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

**Abstract: Objective** To investigate the feasibility of green fluorescent protein(GFP) as a marker to trace the transplanted umbilical cord mesenchymal stem cells (ucMSCs) in rats with cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** ucMSCs were transfected by GFP-adenovirus. The rats were subjected to left middle cerebral artery occlusion using suture method.  $1 \times 10^6$  GFP-ucMSCs were transplanted with cerebral stereotaxic technique. Frozen sections of brain tissue were made at 7 d after cerebral ischemia. The expression of GFP was observed by fluorescence microscope. **Results** In vitro, the morphology of GFP in ucMSCs was fibrous, and when fused, the clusters were arranged in a radial or whirlpool shape. The morphological feature of transfected ucMSCs was similar to that un-transfected ucMSCs. Under the fluorescence microscope, the positive rate of GFP was more than 80%. In addition, GFP could spread to the whole cells and show the completed form. No rejection was observed in the rats after transplantation, and the GFP was found near the site of transplantation after 7 d, and the fluorescence was not attenuated. **Conclusion** GFP is an effective tracer maker for ucMSCs transplantation in the treatment of ischemia-reperfusion, which could provide experimental method for further study.

**Key words:** green fluorescent protein; cerebral ischemia-reperfusion; umbilical cord mesenchymal stem cells; trace

脑卒中等脑血管病是发生在脑部血管内血液循环障碍而造成脑组织损伤的一种疾病, 因其高发病率、高病死率和高致残率, 严重影响人们的生存及生活质量, 给家庭、社会带来沉重的经济和精神负担。其中, 脑血管局部动脉粥样硬化、血栓脱落及血管损伤等导致脑供血动脉栓塞而引起的缺血性脑卒中中最常见, 临床通过溶栓、使用抗凝药物等改善脑血循环, 但由于其存在出血的风险和治疗时间窗的狭窄性, 使得绝大多数患者无法得到有效救治, 且血管再通易导致脑组织缺血在再灌注过程中, 诱发氧自由基连锁反应, 进一步加重脑组织损伤<sup>[1]</sup>。近年来, 间充质干细胞(MSCs)以其高度自我复制及多向分化能力成为组织工程再生的理想细胞。笔者前期的研究证实, 人脐带间充质干细胞(ucMSCs), 具有来源丰富, 不造成伤害, 免疫原性低, 相对更加原始等特点<sup>[2-3]</sup>, 使其在临床应用上具有独特的优势和广阔的应用前景。细胞移植治疗需要研究移植细胞的转归及分化, 那么, 如何追踪其在宿主体内的存活、定位至关

重要。绿色荧光蛋白(GFP)技术已成为一种成熟的示踪技术, 具有稳定、无毒的特点。本实验将腺病毒转染 GFP 标记的 ucMSCs 通过脑立体定位技术移植入脑卒中大鼠脑内, 观察 GFP 在脑内的表达, 探索其作为 ucMSCs 修复脑缺血再灌注示踪标记物的可行性。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** SD 大鼠, 雄性, 250~300 g(上海捷思杰), 腺病毒转染 GFP 标记的 ucMSCs(中国科学院干细胞库), DW-5 动物脑立体定位仪(四川成都泰盟), 干细胞培养基(美国 Sciencell)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物分组** 18 只 SD 大鼠分为 3 组, 每组 6 只。对照组: 不做处理; 模型组: 线栓法造模, 给予 PBS; ucMSCs 移植组: 线栓法造模, 造模 24 h 后, 立体定位仪定位于 MCAO 最初损害部位纹状体, 注射移植干细胞  $1 \times 10^6$  个/只。

\* 基金项目: 江苏省中医药局科技项目(国家中医临床研究基地开放课题)(JD201504)。

作者简介: 曹慧玲, 女, 主管技师, 主要从事检验基础研究工作。

**1.2.2 脑缺血再灌注损伤模型建立** 动物用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉。仰卧位固定，颈正中中线切口，沿胸锁乳突肌内缘分离肌肉，分离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)，在 CCA 远心端和近心端及 ECA 处用动脉夹夹闭，然后，在近心端结扎 CCA、ECA。在距 CCA 分叉部 4 mm 处剪一小口，将栓线插入到 ICA，这时用 CCA 远心端的细线轻轻系牢栓线。从血管分叉处开始算，当插入深度在 18 mm 时，紧紧系牢 CCA 远心端的细线，动作轻柔，不要使 ICA 有任何的牵拉，否则会栓线脱出 CCA。血管外栓线不要留得过长，更不要缝在皮外，大鼠会自行拔出。缝合伤口，单笼饲养观察。缺血后 2 h 小心抽出栓线，形成脑缺血再灌注损伤模型。

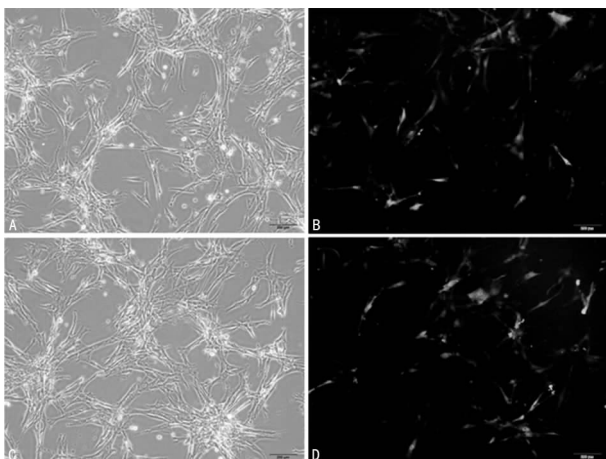
**1.2.3 干细胞移植** 造模 24 h 后，将 GFP 标记的 ucMSCs 体外培养扩增，采用脑立体定位仪进行脑内移植(图 1)，取 GFP-ucMSCs 20  $\mu$ L 细胞悬液 ( $1 \times 10^6$  细胞)缓慢注射 (AP-0.5 mm; L-3.0 mm; V-5.0 mm)，速度为 5  $\mu$ L/min，留针 5 min，于造模后 7 d 取脑固定，制作冰冻切片(厚 20  $\mu$ m)。



图 1 脑立体定位移植 ucMSCs

**2 结果**

**2.1 ucMSCs 体外培养及 GFP 标记** ucMSCs 体外培养呈纤维细胞状，融合时聚集成簇，呈放射状或漩涡状排列，经腺病毒转染的 GFP-ucMSCs 形态与未转染无差别，荧光显微镜下可见转染阳性率达 80% 以上，且荧光扩散至整个细胞，可以反映细胞的完整形态，选取第 4 代细胞用于动物移植，见图 2。

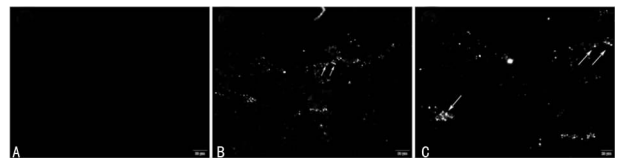


注：A 代表第 3 代 ucMSCs；B 代表第 3 代 ucMSCs GFP 表达；C 代表第 4 代 ucMSCs；D 代表第 4 代 ucMSCs GFP 表达。

图 2 ucMSCs 体外培养及 GFP 转染

**2.2 ucMSCs 在脑组织中的定位** 第 4 代细胞用于动物移植，造模 7 d 后大鼠脑组织移植部位附近及病灶区域(纹状体及皮质)均可见 GFP 阳性(绿色荧光)细胞，GFP 强表达，荧光

未见衰减，见图 3。



注：A 代表模型组大鼠脑组织；B、C 代表 ucMSCs 移植组大鼠脑组织(箭头所指为 GFP 定位)。

图 3 ucMSCs 在脑组织中的定位

**3 讨论**

缺血再灌注引起的脑损伤严重损害人类的健康，传统治疗有限，细胞生物疗法为脑卒中患者带来新的希望<sup>[4]</sup>。ucMSCs 不仅具有自我更新及多向分化的干细胞特性，而且以免疫源性低、更加原始、取材更为安全等优势广泛应用于移植替代治疗<sup>[5-6]</sup>。笔者前期将 ucMSCs 用于治疗大鼠肾缺血再灌注损伤及药物性肝损伤，均取得了显著的疗效，实验证实 ucMSCs 能有效修复损伤组织，可能通过转归、分化、旁分泌等机制达到修复作用<sup>[2]</sup>。本实验将 ucMSCs 应用于脑损伤治疗，观察 ucMSCs 对于脑缺血再灌注损伤的修复作用，如果要深入研究 ucMSCs 的定位与分化，则需要一种较好的示踪技术来追踪细胞在体内的定位和迁移。

目前，用于体内示踪的示踪剂主要有胸腺嘧啶核苷的类似物(BrdU)、红色荧光染料(PKH26)、GFP 等。BrdU 在细胞分裂时掺入到 DNA 中来标记细胞，但易干扰细胞 DNA 的稳定而导致细胞死亡，且随着细胞的增殖而衰减；PKH26 虽不影响细胞的增殖，但后期检测过程中荧光不稳定<sup>[7]</sup>；GFP 最初是由学者于 1962 年从水母中发现的，由于在紫外或蓝光的激发下可产生绿色荧光，且具有荧光稳定，不需要任何反应底物，对细胞无毒无害，易于观察等优势，广泛应用于诸多生物学领域，通常学者通过构建融合基因，转染细胞表达，借助荧光显微镜即可进行细胞内活体观察<sup>[8-10]</sup>。国内外学者已将 GFP 用于干细胞的体内示踪，观察干细胞的定位及迁移情况，结合荧光免疫组织化学技术观察细胞在体内的转化<sup>[11-12]</sup>。但用于标记 ucMSCs 治疗脑损伤的报道少见。本实验利用腺病毒转染 GFP 的 ucMSCs 脑立体定位移植于脑损伤区域，观察 GFP 在实验观察时间内的示踪情况。结果显示，体外 ucMSCs 经腺病毒转染，GFP 阳性率可达 80% 以上，且荧光扩散至整个细胞，展现细胞的完整形态，有利于在活细胞水平观察细胞的生长，与文献报道相一致<sup>[13]</sup>。GFP 表达阳性的 ucMSCs 经过脑立体定位移植入大鼠受损脑组织，发现移植第 6 天在大鼠脑纹状体及皮质部位均可检测到 GFP 表达，说明 ucMSCs 定位于受损脑组织周围发挥修复作用，GFP 在 7 d 内荧光未衰减，作为示踪剂可以较好地反映 ucMSCs 在体内的情况。

综上所述，ucMSCs 是治疗脑缺血再灌注损伤的新途径，其定位与转化等深入研究需要适合的示踪技术，GFP 作为 ucMSCs 的有效示踪剂为细胞水平的各种研究及体内移植细胞的研究提供了实验手段。

**参考文献**

[1] Gutiérrez-Fernández M, Otero-Ortega L, Ramos-Cejudo J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a strategy to improve recovery after stroke[J]. Expert Opin Biol Ther, 2015, 15(6): 873-881. (下转第 2693 页)

- 360-363.
- [5] 俸家富. 急性肾损伤的实验室检测标志物[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(6): 410-414.
- [6] Torregrosa I, Montoliu C, Urios A, et al. Urinary KIM-1, NGAL and L-FABP for the diagnosis of AKI in patients with acute coronary syndrome or heart failure undergoing coronary angiography [J]. *Heart Vessels*, 2015, 30 (6): 703-711.
- [7] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. Novel biomarkers early predict the Severity of acute kidney injury after cardiac surgery in adults [J]. *Ann Thorac Surg*, 2009, 88(1): 124-130.
- [8] Cooper DS, Basu RK, Price JF, et al. The kidney in critical cardiac disease; proceedings from the 10th international conference of the pediatric cardiac intensive care society [J]. *World J Pediatr Congenit Heart Surg*, 2016, 7(2): 152-163.
- [9] 温昱鹏, 常诚, 王仲伦, 等. 儿童非紫绀型先天性心脏病体外循环术后急性肾损伤相关危险因素分析 [J]. *天津医药*, 2015, 43(5): 515-517.
- [10] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2009, 54 (6): 1012.
- [11] 郭露露, 赵卫红. NGAL 与肾脏疾病研究进展 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2015, 31(2): 156-160.
- [12] 刘会琼, 范太兵, 袁心刚. 胱抑素 C 和 NGAL 与先天性心脏病患儿术后急性肾损伤的相关性研究 [J]. *中国实用医药*, 2016, 11(10): 42-43.
- [13] 王静, 崔红蕊, 胡秀红, 等. 尿 NGAL、KIM-1 对先天性心脏病患儿术后急性肾损伤的预测价值 [J]. *山东医药*, 2016, 56(48): 92-94.
- [14] Srisawat N, Murugan R, Lee M, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts recovery from acute kidney injury following community-acquired pneumonia. [J]. *Kidney Int*, 2011, 80(5): 545-552.
- [15] Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(7): 4135-4142.
- [16] 谷翠芝, 李清初, 曾凝, 等. 急性肾损伤患者 NGAL、KIM-1 与血肌酐的相关性 [J]. *广东医学*, 2015, 18(20): 3179-3181.
- [17] 江洁龙, 苏克亮, 袁园, 等. 尿肾损伤分子-1 在急性肾损伤诊断中的价值 [J]. *中国临床保健杂志*, 2015, 13(3): 249-251.
- [18] Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury [J]. *Ann Intern Med*, 2008, 148(11): 810.
- [19] 王琳, 崔应麟, 王长安, 等. 肾移植术后并发急性肾损伤患者尿液中 NGAL 水平及临床意义 [J]. *中国医药科学*, 2016, 6(15): 9-12.

(收稿日期: 2017-02-13 修回日期: 2017-05-07)

(上接第 2689 页)

- [2] Cao H, Qian H, Xu W, et al. Mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord ameliorate ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats [J]. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(5): 725-732.
- [3] Cao H, Hui Q, Yan Y, et al. Pretreatments with injured microenvironmental signals altered the characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(1): 157-165.
- [4] Lin YC, Ko TL, Shih YH, et al. Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2011, 42(7): 2045-2053.
- [5] Hsieh JY, Wang HW, Chang SJ, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72604.
- [6] Cheng Q, Zhang Z, Zhang S, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against ischemic brain injury in mouse by regulating peripheral immunoinflammation [J]. *Brain Res*, 2015, 1594: 293-304.
- [7] 王艳, 闵鹤鸣, 张苗苗, 等. 脑缺血再灌注损伤后 BMSCs 不同示踪方式的比较 [J]. *天津医药*, 2015, 43(12): 1377-1381.
- [8] 王阳, 曹志强. 绿色荧光蛋白转基因大鼠骨髓间充质干细胞的分离鉴定 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 1(37): 5923-5928.
- [9] 张玲, 翁云层, 张云, 等. 重组慢病毒载体介导不同启动子驱动的绿色荧光蛋白在多种(不同)细胞中的表达影响 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(3): 161-165.
- [10] Liu N, Zhang Y, Fan L, et al. Effects of transplantation with bone marrow-derived mesenchymal stem cells modified by Survivin on experimental stroke in rats [J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 105-115.
- [11] 韩志桐, 苏宁, 吴日乐, 等. GFP 转基因小鼠神经干细胞移植治疗大鼠帕金森病的实验研究 [J]. *临床神经外科杂志*, 2012, 9(3): 139-142.
- [12] 杜杰, 高小青, 涂江义, 等. 绿色荧光蛋白作为骨髓间充质干细胞示踪标记物在脑出血脑内的表达 [J]. *重庆医学*, 2011, 40(14): 1364-1366.
- [13] 惠玲, 刘毅, 宋枚. 绿色荧光蛋白和胰岛素基因共表达重组腺病毒载体的构建及感染人脐带间充质干细胞的实验研究 [J]. *解放军医药杂志*, 2013, 25(10): 6-10.

(收稿日期: 2017-04-07 修回日期: 2017-05-25)