

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.11.002

## CM-Dil 标记示踪间充质干细胞可行性的体外试验\*

陈小莹,李欣然,王清,付霞霏<sup>△</sup>

(南方医科大学珠江医院妇产科,广州 510282)

**[摘要]** **目的** 探讨氯苯甲酰氨-1,1'-双十八烷基-3,3',3',3'-四甲基吡啶羧基花青高氯酸盐(CM-Dil)体外标记骨髓间充质干细胞的可行性。**方法** 分离培养并鉴定大鼠骨髓间充质干细胞,分别用 1、2、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CM-Dil 标记间充质干细胞,观察标记后 15 min、24 h、48 h、72 h、传 5 代、传 8 代的标记率;用流式细胞仪检测标记前后细胞周期的变化;用细胞计数 Kit-8(CCK8)法检测细胞增殖能力。**结果** 采用全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞 CD44、CD29 表达阳性,CD34、CD45 表达阴性。1、2、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CM-Dil 标记 15 min 后标记率分别为  $(31.60 \pm 1.25)\%$ 、 $(88.73 \pm 1.79)\%$ 、 $(96.89 \pm 1.31)\%$ ,差异有统计学意义( $F=1\ 757.21, P=0.000$ );4 组间生长曲线趋势大致相同,且 4 组间  $G_1$  期、S 期及  $G_2/M$  期细胞百分比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CM-Dil 细胞标记率高,无细胞毒性,可作为一种高效而稳定的体外标记间充质干细胞的方法。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞;CM-Dil;细胞标记示踪

**[中图法分类号]** R394.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)11-1436-04

### Feasibility of CM-Dil labeling bone-marrow mesenchymal stem cells in vitro\*

CHEN Xiaoying, LI Xinran, WANG Qing, FU Xiafei<sup>△</sup>

(Department of Obstetrics & Gynecology, the Affiliated Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate feasibility of CM-Dil labeling mesenchymal stem cells in vitro. **Methods** We separate, culture and identify rat bone marrow mesenchymal stem cells, after labeling MSCs with CM-Dil concentration respectively in 1, 2, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , observe label rate of MSCs after 15 min, 24 h, 48 h, 72 h, 5 passage and 8 passage, then detect cell cycle with FCM and cell proliferation capability with CCK8. **Results** MSC cultured with the whole bone marrow adherent method were strongly positive for CD44, CD29 and negative for CD34, CD45. The label rates of MSC 15 min after labeled with CM-Dil 1, 2, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were respectively  $(31.60 \pm 1.25)\%$ ,  $(88.73 \pm 1.79)\%$ ,  $(96.89 \pm 1.31)\%$ , and there has statistically difference ( $F=1\ 757.21, P=0.000$ ); the growth curve of the 4 groups was similar, and the percentages of  $G_1$  phase, S phase and  $G_2/M$  phase between the 4 groups have no statistically difference ( $P>0.05$ ). **Conclusion** CM-Dil in concentration 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  has high label rate and low cytotoxicity, therefore could be a efficient and stable method of labeling MSCs.

**[Key words]** bone marrow mesenchymal stem cell; CM-Dil; cell label

干细胞是一类能自我增殖、具有多向分化潜能的细胞,由于其临床应用的可行性及其生物学的重要特性,干细胞治疗成为现代医学研究领域的热点<sup>[1]</sup>。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有取材容易、可自身移植避免免疫排斥等优点,已被广泛应用于组织工程和细胞治疗的研究中<sup>[2]</sup>。而在深入进行细胞移植实验前应对移植的 MSCs 进行标记起到体内示踪的作用。本试验采用细胞膜荧光染料氯苯甲酰氨-1,1'-双十八烷基-3,3',3',3'-四甲基吡啶

羧基花青高氯酸盐(CM-Dil)标记大鼠骨髓间充质干细胞,并进行体外传代培养,观察其标记情况,为进一步利用 MSCs 进行移植研究提供实验基础。

#### 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 4 周龄近交系 SPF 级 Wistar 雌性大鼠,体质量 80 g,购自南方医科大学实验动物中心[许可证号:SYXK(粤)2011-0074]。

**1.2 材料** Wistar 大鼠骨髓间充质干细胞及其完全培养基购自广州赛业生物科技有限公司、PBS 缓冲

\* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81300462)。

作者简介:陈小莹(1991—),在读硕士,主要从事妇科内分泌研究。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: xf1997@163.com。

液购自 Hyclone 公司、胰蛋白酶购自 Gibco 公司、CM-Dil 标记液购自 Thermo Fisher Scientific 公司、细胞计数 Kit-8 (CCK8) 试剂盒购自日本 Dojindo 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 骨髓间充质干细胞的分离培养** 无菌条件下分离大鼠双侧股骨及胫骨,用剪刀从中间剪断股骨及胫骨,用 5 mL 注射器抽取适量含 10% 胎牛血清的专用培养基冲洗骨髓腔,将所得细胞悬液直接接种于 T-25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,细胞浓度约为  $1 \times 10^9$ /L。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养。48 h 后半量更换完全培养基。以后每 2~3 天全量更换新鲜培养基,待细胞融合约 80% 时可进行 1:2 传代,用 0.25% 胰酶消化,以  $5 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> 细胞浓度传代扩增。用倒置显微镜观察细胞形态,取第 3 代细胞用于以下试验。

**1.3.2 骨髓间充质干细胞的鉴定** 将贴壁细胞制成单细胞悬液,用流式细胞仪检测细胞表面标记 CD34、CD29、CD45、CD44。

**1.3.3 CM-Dil 标记骨髓间充质干细胞** 试验分 4 组:MSC 组、标记组 1 (1 μg/mL)、标记组 2 (2 μg/mL)、标记组 3 (4 μg/mL)。将细胞消化制成细胞浓度约为  $1 \times 10^6$ /mL 的细胞悬液,标记组 1~3 分别加入适量 1 mg/L 的 CM-Dil 存储液,使其最终浓度分别达 1、2、4 μg/mL,随后置于培养箱 37 °C 下孵育 30 min,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,PBS 冲洗 2 遍,用完全培养基重悬接种于培养瓶。

**1.3.4 CM-Dil 标记率的观察** 标记完成后 15 min 继续孵育 24、48、72 h 在荧光显微镜下观察各组细胞形态并检测骨髓间充质干细胞的 CM-Dil 阳性标记率,阳性标记率为随机取 10 个非重叠视野 (×100),计算 CM-Dil 阳性细胞数占总细胞数的比例。细胞融合约 80% 时消化传代培养,每次传代后观察细胞形态及标记率。

**1.3.5 CM-Dil 标记细胞增殖能力检测** 细胞标记后直接以细胞浓度为  $1 \times 10^4$ /mL 接种于 96 孔板中,每组 35 孔细胞,每孔体积 100 μL。每天 08:00 每组各取 5 孔细胞,加入 10 μL CCK8 孵育 4 h 后,用全自动酶标仪检测 490 nm 吸光度 (OD) 值,连续 7 d,并绘制生长曲线。

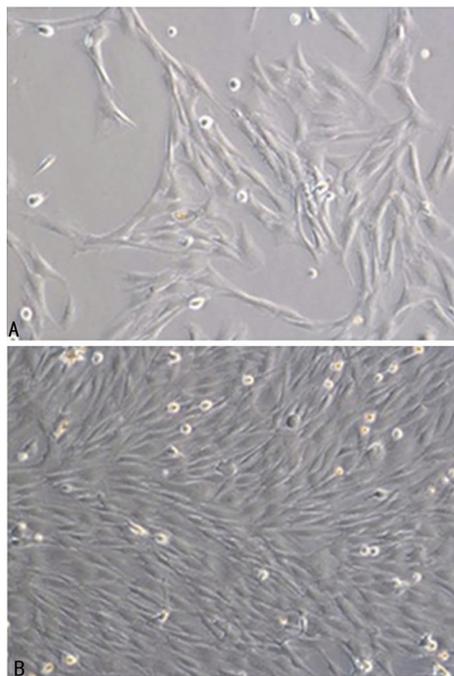
**1.3.6 CM-Dil 标记细胞周期检测** 细胞标记后 48 h 制备成细胞悬液,利用 PI-流式细胞仪技术检测细胞周期。

**1.4 统计学处理** 用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较用单因素方差分析 (ANOVA),组间两两比较采用 SNK-*q* 检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异

有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 骨髓间充质干细胞培养** 采用全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞,刚分离接种时细胞为圆形、椭圆形,接种 24 h 后在倒置显微镜下观察发现,开始有少部分细胞贴附于瓶底。72 h 后绝大部分细胞贴壁,呈梭形或多角形,呈集落样生长。培养 5~7 d 后,细胞达 80% 融合,可进行细胞的首次传代。传代后细胞较原代略大,经 4~5 d 即可达 80% 融合。经传 3~4 代后,细胞为长梭形,形态均一,排列有序 (图 1)。



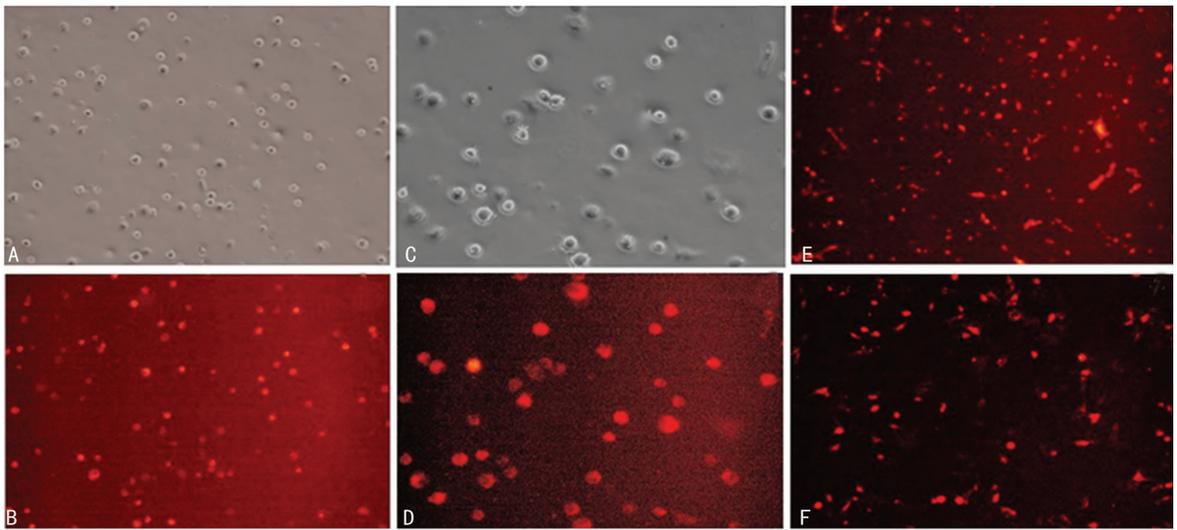
A: 原代 MSCs 第 3 天 (×100); B: 第 3 代 MSCs (×100)

图 1 原代及第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞

**2.2 MSCs 鉴定** 经流式细胞仪检测,90% 以上细胞 CD34 和 CD45 表达阴性,CD44 和 CD29 表达阳性。

**2.3 CM-Dil 标记后细胞荧光表达情况及形态变化**

CM-Dil 浓度为 1、2、4 μg/mL 标记后 15 min 即见到红色荧光 (图 2),标记率分别为  $(31.60 \pm 1.25)\%$ 、 $(88.73 \pm 1.79)\%$ 、 $(96.89 \pm 1.31)\%$ 。4 μg/mL 组标记率明显高于其他两组,经 ANOVA 分析,3 组间差异有统计学意义 ( $F = 1\,757.21, P = 0.000$ )。采用 SNK 法进行两组间比较,1 μg/mL 组与 2、4 μg/mL 组比较差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),2 μg/mL 组与 4 μg/mL 组比较差异也具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。而各组染色后 24、48、72 h 的细胞标记率进行组内比较则差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。细胞标记后传代至第 6 代时荧光表达仍较强,之后荧光强度开始衰减。标记的细胞在绿色荧光激发下呈现红色荧光,且细胞形状同未染色细胞大致相同。



A:悬浮 MSC 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CM-Dil 标记 15 min(白光 $\times 100$ ); B:悬浮 MSC 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CM-Dil 标记 15 min(荧光 $\times 100$ ); C:悬浮状态 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CM-Dil 标记 MSC 第 3 代(白光 $\times 200$ ); D:悬浮状态 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CM-Dil 标记 MSC 第 3 代(荧光 $\times 200$ ); E:贴壁 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CM-Dil 标记 MSC 第 6 代(荧光 $\times 100$ ); F:贴壁 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CM-Dil 标记 MSC 第 8 代(荧光 $\times 200$ )

图 2 MSC 用 CM-Dil 标记后的荧光表达情况

**2.4 标记细胞增殖能力的检测** 4 组 MSCs 的生长曲线如图 3 所示。细胞增殖能力的检测结果表明不同标记浓度组与未标记组的细胞生长趋势相似,表明 CM-Dil 标记后 MSCs 的增殖不受影响。

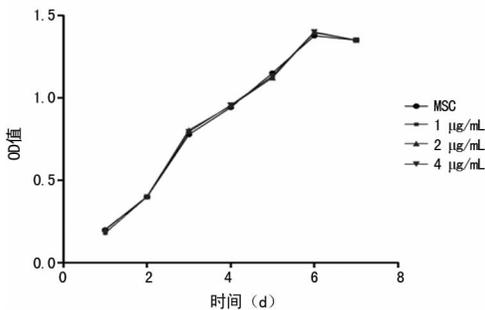


图 3 4 组 MSCs 的生长曲线

**2.5 标记细胞细胞周期的检测** 由表 1 可见,4 组间细胞周期  $G_1$  期、S 期及  $G_2/M$  期百分比比较差异无统计学意义 ( $F=1.665, P=0.251; F=1.317, P=0.335; F=2.159, P=0.171$ ), 表明标记后细胞周期并没有改变,无细胞增殖阻滞,提示 CM-Dil 对 MSCs 无细胞毒性。

表 1 4 组细胞细胞周期比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	$G_1$ 期	S 期	$G_2/M$ 期
MSC 组	75.66 $\pm$ 1.21	11.74 $\pm$ 1.27	12.63 $\pm$ 1.51
标记组 1	74.36 $\pm$ 0.63*	12.65 $\pm$ 0.46*	13.29 $\pm$ 0.42*
标记组 2	73.22 $\pm$ 1.30*	12.30 $\pm$ 1.18*	14.48 $\pm$ 0.19*
标记组 3	74.58 $\pm$ 1.92*	11.27 $\pm$ 0.38*	14.15 $\pm$ 1.54*

\*:  $P>0.05$ , 与 MSC 组比较

### 3 讨 论

骨髓间充质干细胞是一种成体干细胞,具有多向

分化的潜能,在特定环境下可分化为神经系统细胞、成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等,其应用前景不可估量。目前骨髓间充质干细胞的分离培养方法主要有:全骨髓贴壁分离法、密度梯度离心分离法等<sup>[3-4]</sup>。本试验采用全骨髓贴壁分离法成功分离大鼠骨髓间充质干细胞。全骨髓贴壁法不仅根据不同细胞的贴壁性来去除杂质细胞,而且还通过不同细胞所需的消化时间不同来达到纯化骨髓间充质干细胞的目的<sup>[5]</sup>。利用造血系细胞悬浮生长,而骨髓间充质干细胞贴壁生长的特性,每次换液去除造血系细胞;再根据骨髓间充质干细胞较成纤维细胞易脱落的特点,传代时严格掌握消化酶的量 and 消化时间,待细胞稍见回缩即终止消化,这样不仅能使骨髓间充质干细胞得到进一步纯化,还能保持细胞的活性。经数次传代,可获得平行状或辐射状的形态均一的梭形骨髓间充质干细胞。经流式细胞仪鉴定证实全骨髓贴壁法获得的大鼠骨髓间充质干细胞纯化程度高,且增殖能力活跃,具有骨髓间充质干细胞的一般生物学特性。

细胞标记在干细胞移植及分化研究中是必不可少的环节。这就需要一种尽可能操作简便、技术可靠、结果可信、便于检测的细胞标记示踪技术。至今为止已有多种细胞标记示踪方法,包括绿色荧光蛋白、5-溴脱氧尿嘧啶核苷、细胞膜或核染料等<sup>[6-8]</sup>,它们各有优缺点。绿色荧光蛋白标记稳定性强,是目前被较为广泛接受的标记方法,但其标记程序复杂繁琐,而且延长组织固定时间荧光信号会受影响<sup>[9]</sup>;4,6-联咪-2-苯基吡啶(DAPI)标记时间短,且标记后细胞停止增殖,不适合体内试验<sup>[10]</sup>;而 5-溴脱氧尿嘧啶核苷的移植细胞死亡后,其中的 BrdU 将会释放出来,并被

邻近细胞摄取而导致出现假阳性<sup>[11]</sup>。

CM-Dil 是一种亲脂性羰花青荧光膜染料,是目前较好的荧光染料。目前可用的亲脂性羰花青,包括 Dil 和 Dio,PKH2 及 PKH26 染料,在标记悬浮细胞过程中有时需要渗透压调节剂或去盐来避免在标记过程中形成染料沉淀。此外,Dil 标记不能在常规组织固定过程中兼容而进行长期保存。与 Dil 不同,CM-Dil 的 CM 基因能与多肽及蛋白上的巯基反应从而使该分子在醛类物质中保持稳定,因此标记后进行固定、脱水及石蜡包埋等操作并不影响其荧光效果。CM-Dil 可在绿色荧光激发下,发射出波长为 570 nm 的红色荧光。本研究对 CM-Dil 标记后细胞进行显微镜下形态观察,发现标记后细胞与未标记细胞的形态无明显异常。另外,CM-Dil 标记后细胞生长曲线的分析说明 CM-Dil 标记后细胞的增殖不受影响,而且细胞周期检测结果表明细胞标记后无细胞阻滞。研究结果提示低浓度 CM-Dil 对细胞没有毒性作用,与马慧雨等<sup>[12]</sup>的研究结果一致。此外,张雅妮等<sup>[13]</sup>的研究还显示,CM-Dil 标记后对大鼠骨髓间充质干细胞的迁移能力并无明显影响。本试验通过比较不同浓度 CM-Dil 对 MSCs 的标记率,发现 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CM-Dil 浓度具有较高的标记率,标记率可达 96% 以上。标记后 15 min 在荧光显微镜下即可看到很强的荧光表达。传至第 6 代时荧光表达仍较强,之后荧光强度开始减弱。荧光强度衰减可能与操作过程中未能完全避光、细胞分裂膜染料减少等有关。

综上所述,本试验通过全骨髓贴壁法获得较高纯度、生物学特征稳定的大鼠骨髓间充质干细胞。全骨髓贴壁法分离培养骨髓间充质干细胞方法简单,成功率高,可作为分离、培养人类骨髓间充质干细胞的可借鉴方法之一,为日后临床应用骨髓间充质干细胞移植治疗疾病提供实验基础。利用 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CM-Dil 标记细胞,标记率高,方法简单可靠,荧光淬灭时间较长,检测方法简便,可直接在荧光显微镜下观察。CM-Dil 标记作为一种高效稳定、用于一定时期内追踪间充质干细胞的标记方法,可用于追踪间充质干细胞体内移植后能否在靶器官定植及分化,在组织工程中有较好的应用前景。

## 参考文献

[1] KOLAJA K. Stem cells and stem cell-derived tissues and

their use in safety assessment[J]. *J Biol Chem*,2014,289(8):4555-4561.

- [2] BIANCO P. "Mesenchymal" stem cells[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*,2014(30):677-704.
- [3] 张猛,冯文磊,王艳杰,等. 全骨髓贴壁法分离培养小鼠骨髓间充质干细胞[J]. *石河子大学学报(自然科学版)*,2015,33(2):164-167.
- [4] 王英慧,郑瑞,陈莉. 密度梯度离心及贴壁分离筛选相结合分离培养大鼠骨髓间充质干细胞[J]. *中国组织工程研究*,2014,18(28):4463-4468.
- [5] 卢宁,赵龙凤,李红,等. 应用全骨髓贴壁法获取高纯度大鼠骨髓间充质干细胞的实验研究[J]. *山西医科大学学报*,2010,41(3):277-280.
- [6] 付霞霏,何援利. 重组腺病毒介导的绿色荧光蛋白基因转染大鼠间充质干细胞的实验研究[J]. *南方医科大学学报*,2007,27(10):1517-1520.
- [7] 高黎,祝华,张荣,等. BrdU 标记人脐带间充质干细胞及对细胞生物学行为影响的体外研究[J]. *重庆医科大学学报*,2014,39(11):1617-1621.
- [8] MOJCA J, TUBA B, MATIJA V, et al. The hazards of DAPI photoconversion: effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem[J]. *Histochem Cell Biol*,2013,139(1):195-204.
- [9] 邓超,黄大昉,宋福平. 绿色荧光蛋白及其应用[J]. *中国生物工程杂志*,2011,31(1):96-102.
- [10] BECCIA M R, BIVER T, PARDINI A, et al. The fluorophore 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) induces DNA folding in long double-stranded DNA[J]. *Chem Asian J*,2012,7(8):1803-1810.
- [11] PAWELCZYK E, JORDAN E K, BALAKUMARAN A, et al. In vivo transfer of intracellular labels from locally implanted bone marrow stromal cells to resident tissue macrophages[J]. *PLoS One*,2009,4(8):e6712.
- [12] 马慧雨,肖菁,杜晓岩. 荧光活性染料(CM-Dil)对人骨髓间充质干细胞增殖能力的影响[J]. *口腔颌面外科杂志*,2011,21(4):251-255.
- [13] 张雅妮,于美娟,冯善伟,等. CM-Dil 标记大鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性探讨[J]. *中国组织工程研究*,2016,20(45):6726-6732.

(收稿日期:2017-09-19 修回日期:2017-12-17)