

Luciferase2/mKate2 双报告基因对小鼠骨髓间充质干细胞的标记及活体光学成像研究

刘静静, 胡晓俊, 李征然, 李 丹, 颜荣华, 覃 杰, 王 劲, 单 鸿*

(中山大学附属第三医院放射科分子影像学实验室//中山大学介入放射学研究所, 广东 广州 510630)

摘 要: 【目的】 Luciferase2/mKate2 双报告基因标记小鼠骨髓间充质干细胞(mMSC), 并进行活体生物发光和荧光双模态光学成像研究。【方法】 全骨髓细胞贴壁分离法提取 mMSC, 进行细胞表面标志物和多向分化潜能的鉴定; CMV-Luciferase2-mKate2 慢病毒感染 mMSC, 根据细胞内远红荧光蛋白 mKate2 的表达水平评估转染效率并利用流式细胞仪进行纯化筛选; 对筛选后的 mMSC (mMSC-CMV-Luc2-mKate2, mKate2⁺ >95%) 进行活体生物发光和荧光双模态光学成像。【结果】 成功分离 mMSC; 表型分析结果显示 mMSC 高表达 Sca-1 (94.5%)、CD44 (99.6%), 低表达 CD11b (0.092%)、CD45 (0.11%); mMSC 具有成脂和成骨分化能力。CMV-Luciferase2-mKate2 慢病毒感染 mMSC 96 h 后, 细胞内 mKate2 的荧光表达率为 22.97%, 经流式细胞仪筛选后 mKate2 表达率大于 95%。对筛选后的 mMSC 进行活体生物发光成像和荧光成像可探测光信号, 光信号强度与细胞数量呈明显线性正相关(生物发光成像为 $R^2 = 0.9893$; 荧光成像为 $R^2 = 0.9226$)。【结论】 CMV-Luciferase2-mKate2 慢病毒转染 mMSC 可稳定表达双报告基因 Luciferase2 和 mKate2, 体外可根据细胞内 mKate2 的表达水平间接评估转染效率、进行细胞筛选, 活体内可同时进行生物发光成像和荧光成像, 为 mMSC 体内移植后生物学行为的研究提供了良好、无创的定量示踪手段。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 示踪; 生物发光成像; 荧光成像

中图分类号: R237

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2014)03-0334-06

Bioluminescence Imaging and Fluorescence Imaging on Murine BM-MSCs Labeled with Dual Optical Reporter Gene of Luciferase2/mKate2

LIU Jing-jing, HU Xiao-jun, LI Zheng-ran, LI Dan, YAN Rong-hua, QIN Jie, WANG Jin, SHAN Hong*

(Laboratory of Molecular Imaging, Department of Radiology, The Third Affiliated Hospital; Interventional Radiology Institute, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To label murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells (mMSC) with Luciferase2/mKate2 reporter genes and track mMSC through both bioluminescent imaging (BLI) and fluorescence imaging. 【Methods】 The mMSC were isolated and propagated by an adhesive screening method. Cell characteristics and multilineage differentiation capacity of mMSC were performed in vitro. mMSC were transfected with the lentivirus CMV-Luciferase2-mKate2 and positive cells were purified by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The purified mMSC (mMSC-CMV-Luc2-mKate2, mKate2⁺ >95%) were tracked by in vivo BLI and fluorescence imaging. 【Results】 mMSC were successfully obtained from murine bone marrow and readily transfected with lentivirus CMV-Luciferase2-mKate2. The transfection efficiency was 22.97%. The FACS phenotype analysis revealed that the mMSC were positive for Sca-1 (94.5%) and CD44 (99.6%), but negative for CD11b (0.092%) and CD45 (0.11%). These cells readily differentiate into adipocytes and osteocytes. The transfected mMSC were purified by FACS and nearly 95% of mMSC were mKate2 positive. Optical signal intensity of mMSC detected by BLI and fluorescence imaging significantly correlated with cell numbers in vivo (BLI: $R^2 = 0.9893$; fluorescence imaging: $R^2 = 0.9226$). 【Conclusion】 CMV-Luciferase2-mKate2 labeled mMSC can stably express

收稿日期: 2014-02-21

基金项目: NSFC-广东联合基金(U1032002); 国家自然科学基金(81071206, 81271621, 81271562); 2010-2012 卫生部临床学科重点项目(No. 164); 国家自然科学基金青年基金(81101097, 81101096)。

作者简介: 刘静静, 在读博士, 研究方向: 干细胞示踪研究, E-mail: liujingjing198631@126.com; * 通信作者: 单鸿, 博士, 博士生导师, 主任医师, E-mail: shanhong@mail.sysu.edu.cn

the dual optical report gene of luciferase2 and mKate2. Transfection efficiency and cell purification could be performed in vitro based on mKate2 expression. This dual optical reporter gene system provided a good, noninvasive and quantitative tracing method for the biological behavior of mMSC after transplantation simultaneously by BLI and fluorescence imaging in vivo.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; tracking; bioluminescent imaging; fluorescence imaging

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2014,35(3):334-339]

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSC)是一类具有自我更新和多向分化潜能的多能成体干细胞。BM-MSC 具有低免疫原性^[1-2]和免疫调节作用^[3-4]使得其成为疾病治疗中的“理想”工具细胞,在再生医学和组织修复治疗方面有着很好的应用前景。对 MSC 体内移植后的分布、定植、存活、增殖等一系列生物学行为的活体示踪在干细胞的研究中是不可或缺的一部分。目前,对 MSC 的示踪主要集中在光学成像技术,其具有无辐射、快速、实时、连续活体监测等优点。然而,目前的研究往往是对 MSC 进行单个报告基因的标记,本研究构建含 Luciferase2/mKate2 的双报告基因慢病毒、标记小鼠骨髓间充质干细胞(murine bone marrow mesenchymal stem cells, mMSC),并利用生物发光成像(bioluminescent imaging, BLI)和荧光成像双模态光学成像方法对体内移植的 mMSC 进行活体定量示踪研究。

1 材料与方法

1.1 小鼠骨髓间充质干细胞的分离培养、细胞表型分析和分化潜能鉴定

1.1.1 小鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养 4-6 周无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性 C57BL/6 小鼠由中山大学实验动物中心提供,通过全骨髓细胞贴壁分离法^[5]获得 mMSC。

1.1.2 小鼠骨髓间充质干细胞的表型分析 选择第 8 代培养的 mMSC 制备单细胞悬液,调整浓度为 1×10^6 细胞/mL,用抗小鼠荧光素抗体 PE-CD44、PE-Sca-1、FITC-CD11b 和 FITC-CD45 (购自 eBioscience 公司)对 mMSC 进行标记。4℃避光孵育 30 min 后,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗 2 次,600×g 离心 5 min,弃去上清液。用 10 g/L 多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)溶液固定,通过流式细胞仪(fluorescence-activated cell sorting, FACS)检测。所有样本检测均在 4 h 内完成。每个样本均设有同型对照。

1.1.3 小鼠骨髓间充质干细胞的分化潜能鉴定

①成脂诱导: 1.0×10^5 细胞/孔的密度接种于 6 孔培养板,待细胞密度大于 90%后,加入含 100 mL/L 胎牛血清、 10^{-8} mol/L 地塞米松、5 μg/mL 胰岛素的 H-DMEM 成脂诱导液,于 37℃、体积分数为 5% CO₂ 恒温培养箱中继续培养,每 3 d 更换新鲜诱导液。诱导分化 20 d 后弃成脂诱导液, PBS 洗 3 次×3 min, 1 g/L 中性甲醛室温固定 30 min, PBS 清洗后加入油红 O 染色 5 min, 蒸馏水冲洗,显微镜(×400)下观察细胞内脂滴的形成情况。②成骨诱导:以 1.0×10^5 细胞/孔的密度接种于 6 孔培养板中。当细胞长至 80%融合时,将培养基更换为含 100 mL/L 胎牛血清、 10^{-8} mol/L 地塞米松、50 μg/mL 维生素 C、10 mmol/L β-磷酸甘油钠的成骨诱导液,于 37℃、体积分数为 5% CO₂ 恒温培养箱中继续培养,每隔 3 d 更换新鲜诱导液。诱导分化第 14 d 吸去成骨诱导液,室温下用 1 g/L 中性甲醛固定 30 min, PBS 清洗后加入茜素红(pH=4)滴染 3~5 min,显微镜(×400)下观察钙结节的形成情况。

1.2 CMV-Luciferase2-mKate2 对小鼠骨髓间充质干细胞的标记

1.2.1 慢病毒包装 取处于对数生长期状态良好的 293FT 细胞用于慢病毒包装。将 6×10^6 个 293FT 细胞种植于直径为 10 cm 的培养皿中, 37℃、体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中培养过夜。转染前换新鲜 Opti-MEM 培养液(Invitrogen 公司)。Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)转染 293FT 细胞,每个直径为 10 cm 的培养皿共转染 3 μg 的慢病毒表达质粒(pLenti-6.3/DEST-CMV-Luciferase2-mKate2, Invitrogen 公司上海制备)和 9 μg 的包装质粒混合物(pLP1, pLP2, pLP/VSVG, Invitrogen 公司)。孵育 12 h 后更换完全培养基。转染 48 h 后收集细胞培养上清, 4℃、2 000 ×g 离心 10 min, 去除细胞残余,并用 0.45 μm 的滤器过滤。将病毒原液在 50 000 ×g 下超速离心 2 h, 去除上清,重悬于 opti-MEM 培养液中,滴度测定后分装成小管保存于-80℃。

1.2.2 慢病毒活性滴度测定 取处于对数生长期状态良好的 293FT 细胞用于慢病毒滴度测定。在 96 孔板中种植 293FT 细胞, 约 8 000 个细胞/孔, 37℃培养过夜。在 DMEM 中加入 20 mL/L 胎牛血清, 再添加 8 $\mu\text{g/mL}$ 的聚酰胺(polybrene), 混合均匀配制成慢病毒稀释用培养基备用。将慢病毒浓缩液用慢病毒稀释用培养基 10 倍比稀释, 分别稀释 10、10²、10³、10⁴、10⁵ 倍(终体积为 250 μL), 然后各取慢病毒稀释液 100 μL 感染 96 孔板中的 293FT 细胞, 每个稀释度两个重复孔。放入 37℃的细胞培养箱中过夜培养。96 h 后, 在荧光显微镜($\times 100$)下观察各孔中荧光细胞数量, 并计算慢病毒滴度。

1.2.3 CMV-Luciferase2-mKate2 慢病毒感染小鼠骨髓间充质干细胞 取处于对数生长期的状态良好 mMSC 用于慢病毒感染。在 12 孔板中种植 mMSC, 37℃、体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中培养。待细胞长至 60%~70% 的密度时, 以 MOI=100 的慢病毒感染细胞, 每孔加入 8 $\mu\text{g/mL}$ 的 polybrene, 12 h 后换为完全培养基。96 h 后置于荧光显微镜($\times 200$)下观察 mKate2 的表达情况并拍照。FACS 检测细胞 mKate2 的阳性率并进行筛选。将转染 CMV-Luciferase-mKate2 的 mMSC 定义为 mMSC-CMV-Luc2-mKate2。

1.3 活体光学成像

分别将 2.2×10^6 、 4.5×10^6 、 9.0×10^6 和 1.8×10^7 个 mMSC-CMV-Luc2-mKate2 悬于 100 μL 生理盐水, 经不同部位皮下分别注射到 3 只无胸腺裸鼠的背部。腹腔注射底物 D-luciferin (150 mg/kg) 10 min 后利用光学成像系统(美国 Caliper 公司, IVIS Lumina II system)进行活体 BLI 和荧光成像, 曝光时间为 1 s。成像后调节 Min 和 Max 值后, 将感兴趣区(regions of interest, ROI)置于发光部

位, 定量分析发光部位的信号强度。荧光成像中激发波长: (530 ± 15) nm, 发射波长: (710 ± 15) nm。

1.4 统计学分析

使用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 光信号强度与细胞数量的线性关系采用线性回归进行分析, R^2 值用来评价回归模型的质量。

2 结 果

2.1 mMSC 的形态及鉴定

分离 mMSC 培养 3 d 后观察, 可见少部分细胞贴壁, 体形小, 多呈梭性、多角形, 后增殖形成大小不等的克隆集落, 较大的克隆内细胞多数伸展呈梭形, 也有三角形、多角形, 随着不断换液, 可见克隆扩大、集落融合(图 1)。当细胞融合为 70%~80% 时进行传代培养, 细胞多呈长梭形排列。流式细胞仪检测第 8 代 mMSC 细胞表型, mMSC 高表达 CD44(99.6%)和 Sca-1(94.5%), 低表达 CD11b(0.092%)和 CD45(0.11%)(图 2)。多向诱导分化

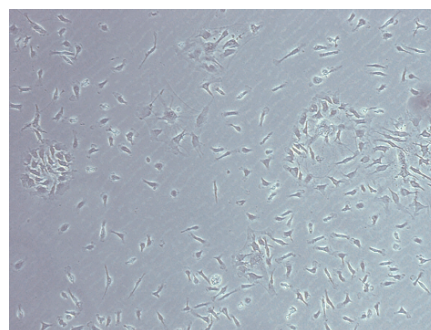


图 1 mMSC 的形态学特征

Fig.1 Morphological characteristics of mMSC

mMSC showed fibroblastic, triangular and polygonal morphology, coupled with colony-forming unit (CFU), $\times 100$

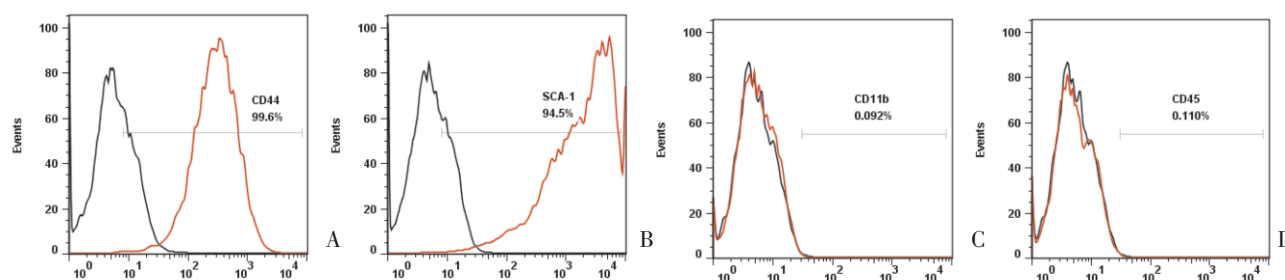


图 2 FACS 检测 mMSC 细胞表型

Fig.2 Cell characteristics of mMSC were performed by FACS

A: CD44(99.6%); B: Sca-1(94.5%); C: CD11b(0.092%); D: CD45(0.11%)

结果显示 mMSC 可分化为脂肪(图 3A)和骨(图 3B)。成脂诱导分化 20 d 后,油红 O 染色结果可见成簇脂肪滴形成。成骨诱导分化 14 d 后,茜素红染色结果可见大量钙结节形成。

2.2 慢病毒在 293FT 细胞的包装及滴度测定

将 pLenti-6.3/DEST-CMV-Luciferase2-mkate2 慢病毒表达质粒和包装质粒混合物共转染 293FT 细胞进行病毒包装。转染 24 h 后,荧光显微镜下可观察到 mkate2 的大量表达(图 4B)。将慢病毒浓缩液分别稀释 10、10²、10³、10⁴、10⁵ 倍后感染 293FT 细胞,96 h 后在荧光显微镜下观察各孔中荧光细胞数量(图 4C,4D,4E,4F,4G)。10、10²、

10³、10⁴ 稀释病毒液感染孔中红色荧光蛋白阳性细胞数太多难以计数;10⁵ 稀释病毒液感染孔中红色荧光蛋白阳性细胞数分别为 20 个和 21 个,则病毒的滴度为:(20+21)/2TU/(2 × 10⁻⁷)mL=1.025 × 10⁸ TU/mL。

2.3 CMV-luciferase2-mKate2 对 mMSC 的标记及流式筛选

慢病毒以 MOI=100 感染 mMSC 96 h 后,荧光显微镜观察可见 mKate2 表达(图 5B),随时间表达数量增加。流式细胞仪检测显示 mKate2 的阳性率为 22.97%(图 5C)。细胞扩增后 FACS 筛选后阳性率可高达 95%以上。

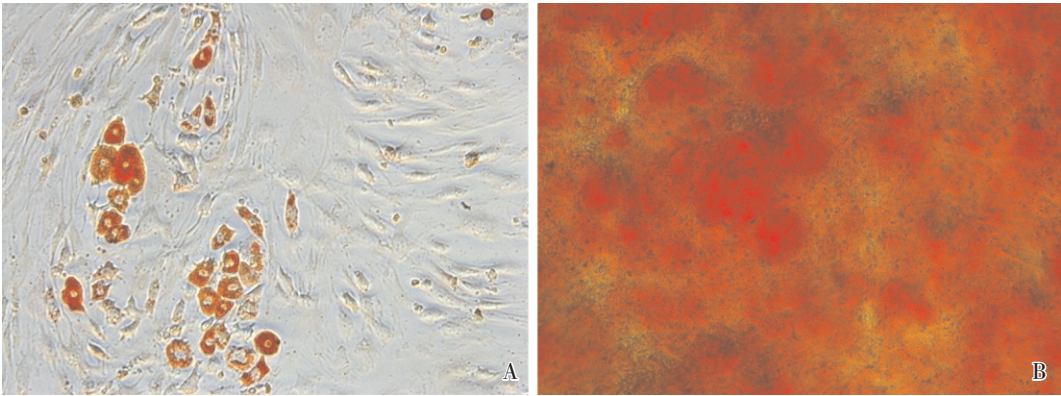


图 3 mMSC 的成脂和成骨分化

Fig.3 Adipocytic differentiation and osteoblastic differentiation of mMSC

A;adipocytic differentiation; B;osteoblastic differentiation, × 400.

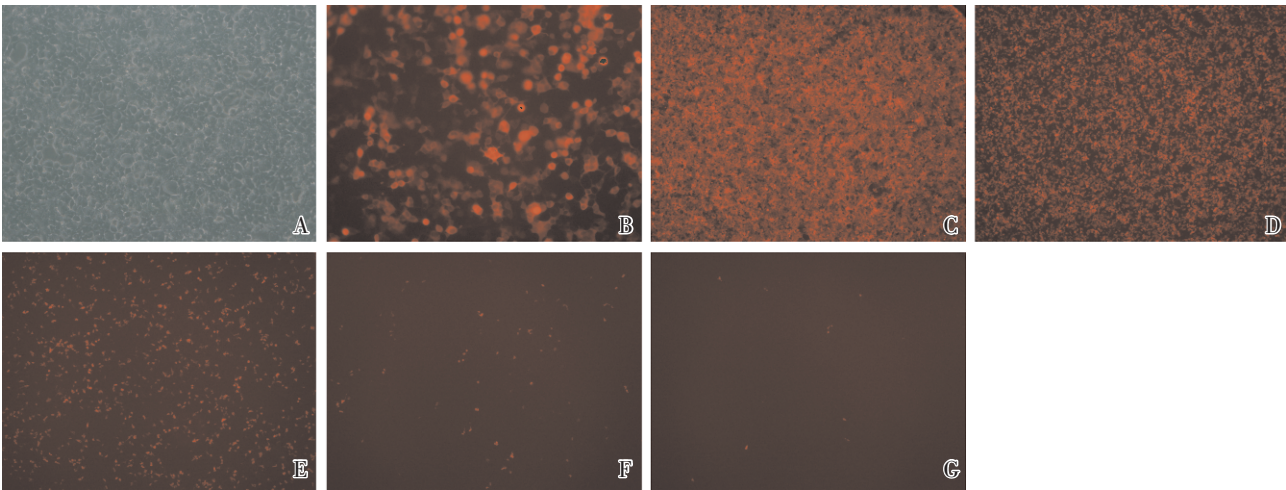


图 4 慢病毒表达质粒和包装质粒混合物共转染 293FT 细胞后 mkate2 的表达情况及病毒滴度测定

Fig.4 mkate2 expression of 293FT after transduction by an optimized mix of an expression plasmid and three packaging plasmids and lentivirus titring

Most 293FT expressed mkate2 after 24 hours transduction(B). mkate2 expression of 293FT after 96 hours transduction of 10-fold serial dilutions of lentiviral stocks(C, D, E, F, G), × 400.

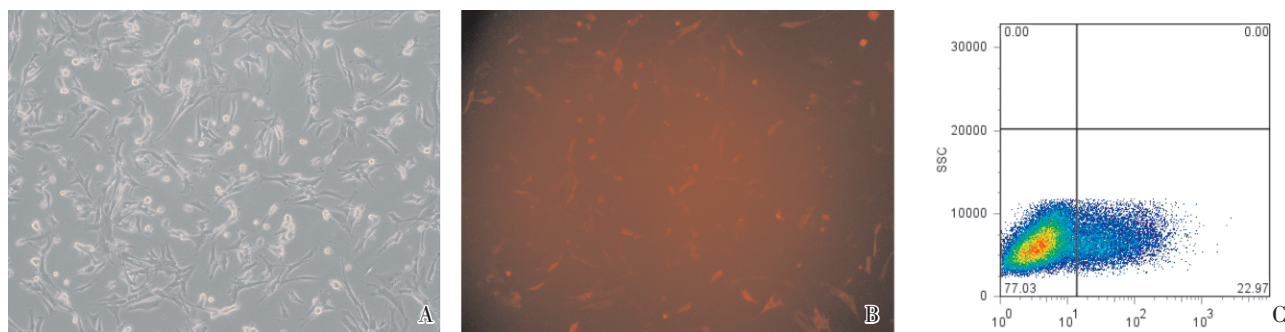


图 5 慢病毒 CMV-Luciferase2-mKate2 感染 mMSC 96 h 后荧光显微镜和 FACS 检测细胞内 mKate2 表达情况

Fig.5 mKate2 expression of mMSC after 96 hours transfection with the lentivirus CMV-Luciferase2-mKate2 by fluorescence microscope and FACS

Fluorescence microscope showed that mKate2 expression of few mMSC after 96 h transfection with the lentivirus CMV-Luciferase2-mKate2 (B). 22.97% mMSC express mKate2 positive by FACS after transfection (C), $\times 400$.

2.4 mMSC-CMV-Luc2-mKate2 的光学成像

mMSC-CMV-Luc2-mKate2 皮下移植后,活体 BLI(图 6A)显示移植后的 2.2×10^6 、 4.5×10^6 、 9.0×10^6 和 1.8×10^7 个 mMSC 的光信号平均强度分别为 $(2.409 \pm 0.9) \times 10^7$, $(5.781 \pm 1.106) \times 10^7$, $(2.658 \pm 0.872) \times 10^8$ 和 $(5.513 \pm 1.073) \times 10^8$ p/s, 荧光成像(图 6C)中光信号分别为 $(5.350 \pm 1.205) \times 10^6$, $(1.127 \pm 0.975) \times 10^7$, $(2.687 \pm 0.899) \times 10^7$ 和 $(3.598 \pm 1.097) \times 10^7$ (p/s)/($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)。活体 BLI 和荧光成像均显示随着移植细胞数的增加,光信号强度也相应增强,且光信号强度与细胞数量呈明显线性正相关(BLI, $R^2 = 0.9893$, 图 6B; 荧光成像, $R^2 = 0.9226$, 图 6D)。

3 讨论

骨髓间充质干细胞具有自我更新能力,可被诱导分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞^[6],而且可以分化为肝细胞、神经组织细胞、心肌细胞及肌细胞等,使其在组织修复和细胞治疗中发挥着重要的作用。目前,对 MSC 移植后的活体动态示踪主要集中在分子影像学的应用,其利用影像学手段研究活体条件下细胞内的生理或病理学过程,并在分子或细胞水平揭示其生物反应,广泛应用于干细胞或疾病过程活体示踪和基因治疗靶点的活体监测,具有无创、实时、整体、动态连续性等优点。目前,最常用的分子影像技术主要有光学成像、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)及核素显像等。MRI 具有高空间分辨率,可以通过对细

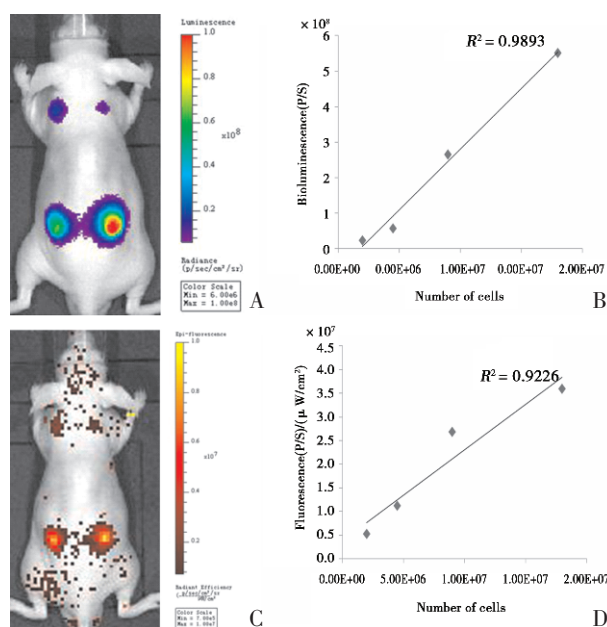


图 6 mMSC-CMV-Luc2-mKate2 的生物发光成像和荧光成像

Fig.6 Bioluminescence imaging and fluorescence imaging of mMSC-CMV-Luc2-mKate2

Bioluminescence imaging (A) and fluorescence imaging (C) showed that optical signal intensity of mMSC significantly correlated with cell numbers in vivo (bioluminescence imaging: $R^2 = 0.9893$, B; fluorescence imaging: $R^2 = 0.9226$, D)

胞标记超顺磁氧化铁纳米粒子(superparamagnetic iron oxide, SPIO)实现示踪^[7],但是 SPIO 不能跟随细胞的分裂而自体复制, MRI 信号将逐渐“稀释”,不能反映体内干细胞增殖的整体状况。核素显像存在对细胞有辐射损伤、观察时间受放射性核素

衰减制约、不能对细胞进行长时间示踪。

光学成像主要包括生物发光和荧光成像两种技术,具有无辐射、可快速、实时、连续活体监测等优点^[8]。活体生物发光成像(bioluminescent imaging, BLI) 是使用荧光素酶(luciferase) 基因标记的细胞,当荧光素酶蛋白表达时给予外源底物,无需激发光,荧光素酶催化底物氧化反应即产生可被CCD 镜头活体检测到的发射光,且只有存活细胞才能够表达报告基因,Luciferase 的活性能够反映细胞真实的存活和增殖情况,具有灵敏度高、特异性强、背景极低的优点,在活体内能检测到 10^2 个细胞,还可用于活细胞数量的定量分析,在同一活体动物连续监测细胞的生长动力学规律^[9-10],在干细胞活体示踪中表现出很好的应用前景。Luciferase2 通过优化密码子和去除转录因子结合位点可以传递4 倍以上的发射光^[11],其比Luciferase 产生的生物光信号要强100 倍以上^[12]。

本研究中利用慢病毒载体成功介导CMV-Luciferase2-mKate2 双报告基因整合到mMSC 基因组中,发现随着细胞的传代,mMSC 可稳定表达双报告基因Luciferase2 和mKate2,可见慢病毒能够介导报告基因的高效标记。Luciferase2 和mKate2 较Luciferase 和mKate 具有更好的活体成像效果。体外可利用荧光显微镜和流式细胞仪观察mMSC 内mKate2 的荧光表达情况,且可根据mKate2 的表达进行流式细胞分选纯化。除此之外,可间接反映细胞内Luciferase2 的表达情况。活体成像中,将不同数量的mMSC-CMV-Luc2-mKate2 皮下移植后,同时进行BLI 和荧光成像发现光信号强度与细胞数量呈明显线性正相关,随细胞数量的增加,光信号强度相应增加,可见BLI 和荧光成像均具有定量分析的能力。

总之,慢病毒载体介导CMV-Luciferase2-mKate2 转染的mMSC 可稳定表达双报告基因Luciferase2 和mKate2,体外可根据细胞内mKate2 的表达水平间接评估转染效率、进行细胞筛选,活体内可同时进行生物发光成像和荧光成像,为mMSC 体内移植后生物学行为的研究提供了良好、无创的定量示踪手段。

参考文献:

[1] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human

bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli[J]. Blood, 2002, 99(10): 3838-3843.

[2] Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide [J]. Blood, 2003, 101(9): 3722-3729.

[3] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. Blood, 2005, 105(4): 1815-1822.

[4] Lin H, Xu R, Zhang Z, et al. Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases [J]. Cell Mol Immunol, 2011, 8(1): 19-22.

[5] Meirelles Lda S1, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization [J]. Br J Haematol, 2003, 123(4): 702-711.

[6] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.

[7] Zhou B, Shan H, Li D, et al. MR tracking of magnetically labeled mesenchymal stem cells in rats with liver fibrosis[J]. Magn Reson Imaging, 2010, 28(3): 394-399.

[8] Frangioni JV, Hajar RJ. In vivo tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease [J]. Circulation, 2004, 110(21): 3378-3383.

[9] Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E. "Firefly rats" as an organ/cellular source for long-term in vivo bioluminescent imaging[J]. Transplantation, 2006, 81(8): 1179-1184.

[10] Edinger M, Cao YA, Verneris MR, et al. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging [J]. Blood, 2003, 101(2): 640-648.

[11] Promega. pGL4 luciferase reporter vectors[J]. Promega Technical Manual, 2007, 12(9): 259-267.

[12] Gil JS, Machado HB, Herschman HR. A method to rapidly and accurately compare the relative efficacies of non-invasive imaging reporter genes in a mouse model and its application to luciferase reporters [J]. Mol Imaging Biol, 2012, 14(4): 462-471.

(编辑 王晓鹰)