·论　著·

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*

杜　杰[1]，高小青[2]，涂江义[2]，杨朝鲜[2△]，邓　莉[2]
（泸州医学院：1.教务处；2.神经生物学研究室与解剖学教研室，四川泸州 646000）

摘　要：目的　探讨利用绿色荧光蛋白（GFP）作为骨髓间充质干细胞（BMSCs）移植治疗脑出血示踪标记物的可行性。**方法**　利用 GFP 空载体重组腺病毒感染 BMSCs，应用脑立体定位仪将感染的 BMSCs 移植入脑出血大鼠纹状体内，移植后 5、14 d，脑组织行冰冻切片，荧光显微镜下观察 BMSCs 在脑组织内分布的表达。**结果**　感染细胞与未感染细胞体外培养形态无差异，感染细胞及其传代细胞发强绿色荧光。荧光显微镜下观察脑出血模型冰冻切片，移植后各时间点在移植部位周围病灶区内有大量发绿色荧光的细胞。**结论**　GFP 感染 BMSCs 能在脑出血大鼠脑内稳定持久表达，表明 GFP 是脑出血干细胞移植治疗的有效示踪标记物，为进一步研究移植细胞在宿主脑内的可塑性研究奠定基础。

关键词：绿色荧光蛋白质类；移植；骨髓间充质干细胞；标记
doi：10.3969/j.issn.1671-8348.2011.14.006　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1671-8348(2011)14-1364-03

Expression of GFP as a marker of BMSCs at brain of cerebral hemorrhage rats*

Du Jie[1]，*Gao Xiaoqing*[2]，*Tu Jiangyi*[2]，*Yang Chaoxian*[2△]，*Deng Li*[2]
（1. *Dean's Office*；2. *Department of Neurobiology*，*Luzhou Medical College*，*Luzhou*，*Sichuan* 646000，*China*）

Abstract：Objective　To explore the feasibility of GFP as a marker to trace transplanted BMSCs in the treatment of cerebral hemorrhage. **Methods**　BMSCs were infected by GFP-adenovirus carrier. And infected BMSCs were transplanted into striatum of cerebral hemorrhage rats by stereotaxis instrument，brain tissues were made into frozen sections after transplantation 5，14 d，then the expression of GFP in the brain were observed by fluorescent microscope. **Results**　The morphological feature of the infected BMSCs was similar to that of uninfected BMSCs. GFP was expressed strongly in infected cells and passaged cells. Transplanted cells in cerebral hemorrhage rats at every time piont launched green fluorescent，and they located lesion region around transplantation site. **Conclusion**　GFP can be expressed stablely and persistently at the brain of cerebral hemorrhage rat，so GFP is an effective marker for cell transplantation in the treatment of cerebral hemorrhage，and to establish the foundation for further study the plasticity of transplanted cells at the host brain.

Key words：green fluorescent protein；transplantation；bone marrow stromal cells；markers

出血性脑卒中是常见的脑血液循环障碍性疾病，脑出血引起大量神经元变性、坏死，传统观点认为成年中枢神经系统神经元丢失后不能再生，这是脑卒中致残的主要原因。骨髓间充质干细胞（bone marrow stromal cells，BMSCs）移植治疗有助于脑卒中神经功能恢复，因而有望成为其治疗的新方法[1-2]。但作为细胞移植治疗，明确区分移植细胞与宿主细胞，追踪移植细胞在宿主体内的存活、分布、分化等非常重要，因而需要有效的标记方法来追踪这些细胞。绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）是一种生物发光蛋白，在紫外光或蓝色光激发下可稳定地发绿色荧光，本实验将 GFP 重组腺病毒空载体感染体外培养的 BMSCs，并将其移植入脑卒中大鼠脑内，观察 GFP 在脑内的表达，探索其作为脑出血干细胞移植治疗的有效示踪标记物的可行性。

1　材料与方法

1.1　材料及动物　DMEM 培养基、胰蛋白酶购自 Gibco，胎牛血清购自 Hyclone。GFP 空载体质量组腺病毒（pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-GFP）由泸州医学院神经生物学研究室构建。成年 SD 大鼠，体质量 250～300 g，由泸州医学院动物实验中心提供。

1.2　方法

1.2.1　BMSCs 体外培养及感染　采用密度梯度离心法从成年大鼠骨髓中分离培养 BMSCs[3]。用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠（30 mg/kg），置入 75%的乙醇中浸泡 3 min，分离出双侧胫骨和股骨，将两端骨骺剪除后，用 DMEM/F12 培养液冲洗骨髓腔，将骨髓冲洗液缓慢加入同体积的淋巴细胞分离液上方，1 500 r/min 离心 30 min，收集交界面细胞层，接种于含 20%胎牛血清的 DMEM 培养基中，在 37 ℃、5%CO_2 饱和湿度环境中培养。24 h 换液以去除未贴壁的造血干细胞，此后每 3～4 d 换液 1 次，待贴壁细胞达到 80%融合时按 1∶2 传代。

将第 3 代 BMSCs（1×10^6 个/毫升）接种入 75 mL 培养瓶，待细胞生长到约 80%融合时，加入 3 mL 培养基和 360 μL GFP 重组腺病毒液（滴度为 1×10^9 pfu/mL），不时缓慢晃动培养瓶，37 ℃孵育 3 h 后再添加 6 mL 培养基培养 2 d。将感染 2 d 的细胞按 1∶2 传代，以后每 3～4 d 传代 1 次。

1.2.2　BMSCs 移植脑出血模型　脑出血模型按照杨朝鲜等[4]的方法制作。用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉成年大鼠（30 mg/kg），俯卧固定于立体定位仪上，头皮正中切口 10 mm，30%双氧水腐蚀暴露前囟及冠状缝，以前囟前 0.2 mm、头尾正中线右侧旁开 3 mm，钻一直径 1 mm 的孔达硬脑膜表面。用 5 号静脉输液针自心脏采血，用微量进样器取血 50 μL 并固定在立体定位仪上，沿钻孔进针，并以颅骨外板为零点垂直进针 6 mm，以 10 μL/min 速度将血推入纹状体内，留针 5 min，缓慢退针，速度为 1 mm/min，骨蜡封闭钻孔，缝合头皮。

调整 GFP 标记的 BMSCs（GFP/BMSCs）浓度为 2.5×10^7 个/毫升备用。利用大鼠脑立体定位仪进行脑内移植，移植时间为术后 3 d，取备用 GFP/BMSCs 20 μL 细胞悬液缓慢注射入纹状体（前囟前 0.2 mm，头尾正中线右侧旁开 3 mm，深度 6.5 mm），移植速度为 5 μL/min，留针 5 min，缓慢退针，骨腊封住颅骨表面针口，缝合头皮。分别于移植后 1、3、5、7、14 d 灌注固定，并将脑组织行冷冻切片（片厚 20 μm）。

*　**基金项目：**四川省教育厅资助项目（09ZA177）。　△　**通讯作者**，Tel：18989133932；E-mail：yangchaoxian2006@tom.com。

2 结　果

2.1 GFP 腺病毒载体体外感染 BMSCs　BMSCs 经 GFP 腺病毒感染后 2 d，荧光显微镜下观察细胞发绿色荧光，呈梭形、三角形及多角形，有的细胞聚集成簇呈放射状或漩涡状排列（图 1），与未感染的细胞形态无差异。对感染的 BMSCs 传代至 15 代，仍可见细胞发明亮绿色荧光。

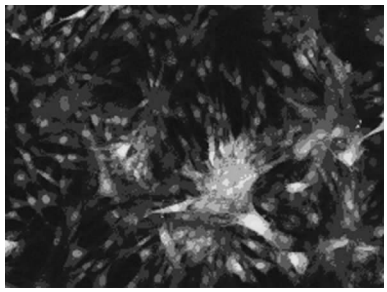

图 1　被 GFP 感染 2 d 后的 BMSCs（×100）

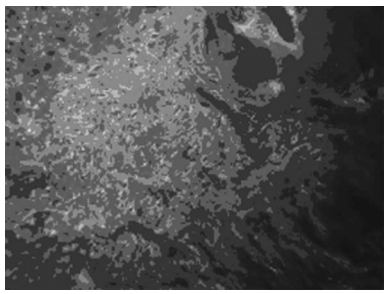

图 2　移植 5 d 时移植部位周围的 GFP/BMSCs（×100）

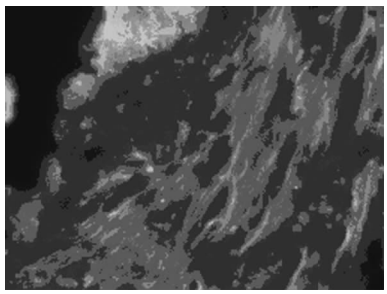

图 3　移植 5 d 时移植部位周围 GFP/BMSCs 发绿色荧光（×200）

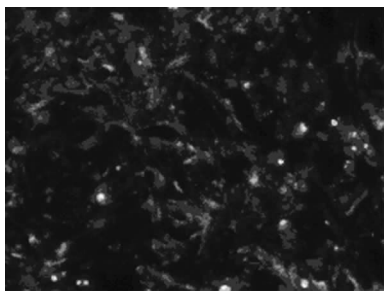

图 4　移植 14 d 时移植部位周围的 GFP/BMSCs（×200）

2.2 GFP/BMSCs 移植入脑出血大鼠纹状体后的表达　GFP/BMSCs 移植入脑出血纹状体后，荧光显微镜下直接观察脑片，在纹状体内可见一明显的注射损伤区，其周边为片状出血区。移植后 1～5 d，绿色荧光细胞多聚集在离移植部位较近的周边病灶组织内（图 2，3）；7～14 d，在距移植部位较近周边病灶区内绿色荧光细胞较少，但在距移植部位较远的病灶区内荧光细胞数量较多，且绿色荧光仍旧强表达（图 4，5）。移植入脑内的细胞形态与体外培养细胞相似，呈梭形、三角形等。

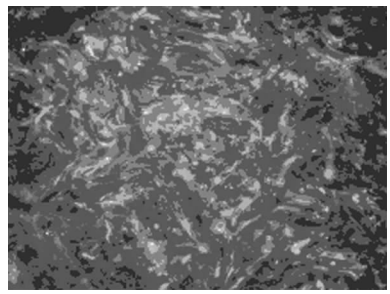

图 5　移植后 14 d 时距移植部位较远处的 GFP/BMSCs（×200）

3 讨　论

出血性脑卒中是严重危害人类健康和生命安全的常见的难治性疾病，细胞替代治疗为脑卒中患者带来了新的希望。BMSCs 是自我更新，多向分化潜能的干细胞，处在不同的微环境中能分化成多个细胞系，形成多种间充质细胞，如成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞等，特别是能够横向分化为神经细胞和胶质细胞。BMSCs 还具有易于获得、培养、增殖，多次传代后仍保持干细胞特性并能定向分化为所需细胞[5-6]。动物实验显示，将其移植入脑卒中大鼠，细胞在体内能存活、迁徙，分化为神经元和胶质细胞，减少梗死体积，改善神经功能症状[7-8]，因此 BMSCs 有望成为移植治疗脑卒中的种子细胞。但是寻求一种良好的示踪剂来追踪这些细胞在体内的表达有重要意义，可直接观察移植细胞在体内的迁徙，有利于进一步检测其与宿主的整合。

GFP 是一类存在于腔肠动物体内的生物发光蛋白，在紫外光或蓝色光激发下发绿色荧光，具有许多显著优点：(1)不用反应底物即可产生绿色荧光；(2)荧光性质稳定；(3)检测方便，用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜，流式细胞仪等可进行活细胞实时观察；(4)易于构建融合蛋白，也不影响融合蛋白的活性，对受体细胞无毒害，细胞仍可连续传代培养。因此 GFP 已成为监测体内基因表达及细胞内蛋白定位、示踪完整活细胞生命现象的重要报告基因，在生物医学领域的应用日益广泛[9]。国内有学者构建增强型绿色荧光蛋白腺病毒载体，表明其可有效地标记真皮多能干细胞，并能很好地示踪和定量分析移植到大鼠体内真皮多能干细胞的分布情况[10-12]。

由于 BMSCs 的良好组织融合性和迁徙能力，使它成为理想的基因治疗载体。基因治疗的关键环节是如何有效地将外源基因导入靶细胞并使其稳定表达，腺病毒载体被认为是高效表达的外源性基因的转移载体[13]，因为腺病毒具有许多优点：(1)宿主范围广，不仅可感染增殖期细胞，也可感染静止期细胞；(2)包容量大，可以插入 7.5 kb 的外源性基因片段；(3)不会整合到宿主细胞的染色体中，不存在激活致癌基因或插入突变等危险；(4)病毒经繁殖、纯化，可达到很高滴度，并达 100% 的感染率。故在基因转移中具有较大优势，成为基因治疗中理想的载体。本实验选用 E1 区缺失的复制腺病毒，通过基因重组技术构建了 GFP 重组腺病毒载体（pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-GFP），体外实验证实其可高效感染 BMSCs，感染细胞的生长状态与未感染的细胞一致，二者形态结构无明显差异。

将感染成功的 BMSCs 移植入脑出血大鼠脑内，荧光显微镜下观察冷冻切片显示，移植后各时间点在移植部位周围病灶区有大量发强绿色荧光的细胞，并且随时间推移在远离移植部位病灶区内的荧光细胞增多，说明 GFP 重组腺病毒载体感染 BMSCs 后并不影响其在脑内的迁徙特性。移植细胞形态呈梭形、三角形，与体外培养细胞相似，整个细胞形态清晰可见，有利于了解植入细胞的存活和生长情况。本实验结果与 Hess

等[14]和文玉军等[15]的结果相似。Hess 等从转基因动物体内获得携带 GFP 的 BMSCs，将其移植入脑卒中脑内，GFP 示踪显示 BMSCs 在脑内能存活，向梗死区迁徙，并分化为有功能的神经元。文玉军等[15]用携带 GFP 的逆转录病毒载体感染 BMSCs 后移植入脑出血大鼠纹状体，在脑出血灶周边至少可存活 4 周，主要分布于出血灶周边，并向周围脑实质迁移。

本实验结果显示，GFP 感染的 BMSCs 在脑出血脑内外均能持久表达绿色荧光蛋白，并扩散至整个细胞，显示出细胞的完整形态，因此，GFP 作为 BMSCs 有效标记物有利于直接在活细胞状态下动态观察细胞生长，方便进行细胞水平上的各种研究，以及有利于追踪体内移植细胞与宿主整合的可塑性研究。

参考文献：

[1] Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, et al. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses[J]. PANS, 2008, 105(38): 14638-14643.

[2] Seyfried D, Ding J, Han Y, et al. Effects of intravenous administration of human bone marrow stromal cells after intracerebral hemorrhage in rats[J]. J Neurosurg, 2006, 104(2): 313-318.

[3] 杜杰，高小青，吴岩，等. 甲状腺激素对大鼠骨髓间充质干细胞分化为少突胶质细胞的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2009，13(1)：31-34.

[4] 杨朝鲜，周玲，袁琼兰，等. 大鼠脑出血后神经行为学和脑组织病理学改变的特点[J]. 中风与神经疾病杂志，2007，24(5)：601-602.

[5] 杨军，杨琴，承欧梅，等. 骨髓基质细胞移植对缺血性脑损伤的修复作用及其机制的研究进展[J]. 重庆医学，2006，4(35)：369-371.

[6] 李宁，吴桂英，李启明，等. 不同氧浓度微环境对大鼠骨髓间充质干细胞成骨及成脂肪分化的影响[J]. 重庆医学，2009，38(19)：2448-2450.

[7] Seyfried D, Ding J, Han Y, et al. Effects of intravenous administration of human bone marrow stromal cells after intracerebral hemorrhage in rats[J]. J Neurosurgery, 2006, 104(2): 313-318.

[8] Seyfried DM, Han Y, Yang D, et al. Mannitol enhances delivery of marrow stromal cells to the brain after experimental intracerebral hemorrhage[J]. Brain Res, 2008, 1224(1): 12-19.

[9] Vourc HP, Romero-Ramos M, Chivatakarn O, et al. Isolation and characterization of cells with neurogenic potential from adult skeletal muscle[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 317(3): 893-901.

[10] 宗兆文，程天民，粟永萍，等. 增强型绿色荧光蛋白腺病毒表达载体构建及其在移植干细胞示踪和定量中的初步应用[J]. 中国临床康复，2006，10(21)：10-12.

[11] 闫国和，粟永萍，王军平，等. 重组真核表达载体 pEGFP-N1/PDGF-A 的构建及真皮干细胞的转染[J]. 第三军医大学学报，2005，27(20)：2005-2008.

[12] 宗兆文，程天民，冉新泽，等. CXCR4 基因转染促进移植真皮多能干细胞向全身照射大鼠骨髓分布的研究[J]. 实用医学杂志，2010，26(2)：193-195.

[13] Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL, et al. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia[J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100(26): 15983-15988.

[14] Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, et al. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke[J]. Stroke, 2002, 33(5): 1362-1368.

[15] 文玉军，吴均，张敏，等. 骨髓基质细胞在大鼠纹状体出血模型脑内的存活及迁移[J]. 宁夏医学院学报，2007，29(3)：234-236.

（收稿日期：2010-10-05 修回日期：2011-01-10）

（上接第 1363 页）

al. Pentylenetetrazol-kindling modulates stimulated dopamine release in the nucleus accumbens[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2000, 66, 425-428

[5] 陈秀，吴万福，胡长林，等. 成年大鼠缺氧性脑损伤后亚临床痫性发作及海马苔藓纤维出芽[J]. 第三军医大学学报，2008，30(1)：49-52.

[6] 陈秀，吴万福，胡卡林，等. 缺氧性脑损伤对大鼠癫痫敏感性和脑内 PSP-95 表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(14)：1353-1356.

[7] Veliskova J, Claudio OI, Galanopoulou AS, et al. Seizures in the developing brain[J]. Epilepsia, 2004, 45(Suppl 8): 6-12.

[8] Cossart R, Bernard C, Ben-Ari Y. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies[J]. Trends Neurosci, 2005, 25(2): 108-115.

[9] 杨娟，黄祖春. 在中枢神经系统发育早期和致痫灶中 GABA 的兴奋性作用研究进展[J]. 重庆医学，2007，36(13)：1269-1271.

[10] Chen WF, Chang H, Huang LT, et al. Alterations in long-term seizure susepibility and the complex of PSD-95 with NMDA receptor from animals previously exposed to perinatal hypoxia[J]. Epilepsia, 2006, 47(2): 288-296.

[11] Raol YS, Budreck EC, Brooks-Kayal AR. Epilepsy after early-life seizures can be independent of hippocampal injury[J]. Ann Neurol, 2003, 53: 503-511.

[12] Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, et al. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines glutamatergic phenotype in neurons[J]. Nature, 2000, 407(3): 189-194.

[13] Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, et al. The existence of a second vesicular lutamate transporter in the rat brain[J]. J Comp Neurol, 2002, 443: 39-62.

[14] Stornetta RL, Sevigny CP, Guyenet PG. Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 mRNA is p resent in C1 and several other groups of brainstem catecholaminergic neurons[J]. J Comp Neurol, 2002, 444: 191-20.

[15] Kaneko T, Fujiyama F, Hioki H. Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the ratBrain[J]. J Comp Neurol, 2002, 444(1): 39-62.

（收稿日期：2010-04-11 修回日期：2010-10-11）