

庞荣清,朱慧,鄢东海,等. GFP 标记脐带间充质干细胞治疗 mdx 小鼠的药代动力学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (2): 54-58.

Pang RQ, Zhu H, Yan DH, et al. Pharmacokinetics study of GFP-labeled mouse umbilical cord mesenchymal stem cells in mdx mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 54-58.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.02.008

GFP 标记脐带间充质干细胞治疗 mdx 小鼠的 药代动力学研究

庞荣清¹, 朱慧^{1,2}, 鄢东海^{1,3}, 王强¹, 李自安¹, 王金祥¹, 于倩倩¹, 阮光萍¹,
朱向情¹, 潘兴华^{1*}

(1. 联勤保障部队第九二〇医院细胞生物治疗中心, 干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合工程实验室, 云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室, 云南省干细胞工程实验室, 昆明 650032;
2. 延安大学医学院, 陕西 延安 716000; 3. 巴东县人民医院, 湖北 巴东 444300)

【摘要】 目的 应用小鼠脐带间充质干细胞(mUCMSC)示踪方法和 mdx 小鼠研究细胞药物的药代动力学。**方法** GFP 转染标记 mUCMSC, 局部注射 0.4 mL(5×10^6 个 GFP-mUCMSC) 细胞悬液到腓肠肌和膈肌损伤的 mdx 小鼠腹腔, 在 1 h、3 h、5 h、24 h、1 周等 5 个时间点用活体成像系统观察小鼠体内的荧光信号, 观察结束后处死小鼠, 采集膈肌制作冰冻切片并在荧光显微镜下观察荧光信号。**结果** mUCMSC 与 MOI 为 150 的病毒载体共培养 72 h 可以成功标记 GFP。局部腹腔注射 0.4 mL(5×10^6 个 GFP-mUCMSC) 后 1 h, 用活体成像系统观察到 mdx 小鼠腹壁下注射细胞的部位有明亮的绿色荧光集中分布, 随着时间延长, 荧光面积逐渐减小, 24 h 后荧光强度明显变弱, 荧光面积大幅缩小, 一周后荧光信号几乎消失; 此时, 在荧光显微镜下仍可观察到 mdx 小鼠膈肌内存在荧光信号, 与未注射细胞的对照组有显著差异($P < 0.05$)。**结论** 注射到腹腔的脐带间充质干细胞可以进入损伤的膈肌, 其 GFP 荧光信号 1 周内逐渐消失, 活体成像系统是监测干细胞体内动态分布和清除率的有效工具。

【关键词】 脐带间充质干细胞; 杜氏肌营养不良症; 绿色荧光蛋白; 药代动力学; 活体成像系统

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 02-0054-05

Pharmacokinetics study of GFP-labeled mouse umbilical cord mesenchymal stem cells in mdx mice

PANG Rongqing¹, ZHU hui^{1,2}, YAN Donghai^{1,3}, WANG Qiang¹, LI Zian¹, WANG Jinxiang¹, YU Qianqian¹,
RUAN Guangping¹, ZHU Xiangqing¹, PAN Xinghua^{1*}

(1. Cell Biological Therapy Center of 920th Hospital of Joint Logistics Support Force, Integrated Engineering laboratory of Cell Biological Medicine of State and Regions, Transfer Medicine Key Laboratory of Cell Therapy Technology of Yunan Province, Stem Cell Engineering laboratory of Yunnan Province, Kunming 650032, China.
2. Medical school of Yanan universit, Yanan 716000. 3. Badong People hospital, Badong 444300)

【Abstract】 Objective The pharmacokinetics of cellular drugs were studied with the mouse umbilical cord mesenchymal stem cells (mUCMSC) tracing method and mdx mice. **Methods** mUCMSC were labeled by GFP

[基金项目] 云南省应用基础研究重点项目(2015FA039); 国家自然科学基金面上项目(31970515)。

[作者简介] 庞荣清, 男, 研究方向: 干细胞与再生医学。E-mail: pangrq2000@aliyun.com

[通信作者] 潘兴华, 男, 教授, 主任医师, 研究方向: 再生医学。E-mail: xinghuapang@aliyun.com

transfection, and a 0.4 mL (5×10^6 GFP-mUCMSC) cell suspension was injected locally into the abdominal cavity of mdx mice with damaged gastrocnemius and diaphragm. The fluorescence signal in the mice was observed with a live imaging system at five timepoints including 1 h, 3 h, 5 h, 24 h, and 1 wk post injection. The mice were euthanized and their diaphragms were collected to obtain frozen sections for fluorescence microscopy. **Results** mUCMSCs were successfully labeled when they were co-cultured with the viral vector at an MOI of 150 for 72 h. One hour after local intraperitoneal injection of the GFP-mUCMSCs, a strong green fluorescent signal was observed with the live imaging system under the injection position on the abdominal wall of the mdx mice, and the fluorescent area gradually decreased with time. After 24 h, the fluorescence intensity was obviously weakened, and the fluorescent area was greatly reduced. These fluorescent signals had almost disappeared after one week. At this time, the fluorescent signals could still be observed in the diaphragm of the mdx mice under the fluorescence microscope, and this signal was significantly higher than that of the control group without cell injection ($P < 0.05$). **Conclusions** Umbilical cord mesenchymal stem cells injected into the abdominal cavity of the mdx mice entered the injured diaphragm and their GFP fluorescent signals gradually disappeared within 1 week. Thus, a live imaging system is an effective tool for monitoring the dynamic distribution and clearance rate of stem cells in vivo.

[Keywords] umbilical cord mesenchymal stem cells; Duchenne muscular dystrophy; green fluorescent protein; Pharmacokinetics; In vivo imaging system

由于取材方便、适于规模化生产、细胞增殖活性强等优点,脐带间充质干细胞已经成为再生医学研究最为广泛的种子细胞之一,是一种具有良好发展前景的细胞药物^[1]。干细胞具有传统药物所不具备的增殖能力、靶向迁移能力、自分泌能力等生物学特性,是现代药代动力学研究的巨大挑战。显然传统药物的药代动力学评估药物吸收、分布、代谢的体系并不适于细胞药物的评估,监测干细胞在体内的分布和清除才是关键^[2]。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记是稳定的体内示踪方法^[3],结合活体成像技术是监测细胞在体内分布的有效手段^[4]。

杜氏肌营养不良症(Duchenne Muscular Dystrophy, DMD)是一种以骨骼肌、膈肌进行性变性、坏死为主要病理特征的遗传性肌病,在出生男婴中的检出率约为 1/3500。由于其家族遗传性的特点,目前尚无有效治疗方法。间充质干细胞具有一定的再生和修复肌肉的作用,是肌营养不良症的潜在治疗药物^[5]。本实验室的前期研究已成功分离、扩增和纯化小鼠脐带间充质干细胞(mouse umbilical cord mesenchymal stem cell, mUCMSC)^[6],还从英国引入 DMD 治疗研究最常用的 X-连锁肌萎缩(X-linked muscular dystrophy, mdx)小鼠,采用 GFP 示踪结合活体成像技术,观察脐带间充质干细胞进入 mdx 小鼠腹腔后的清除速率和组织靶向性,为脐带间充质干细胞用于肌病治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

经鉴定 5 只清洁级 mdx 小鼠,雌性 3 只,雄性 2 只,体重 22~26 g,确定性别后随机分为实验组(1♂2♀)和对照组(1♂1♀),48 周龄(这个年龄已出现明显腓肠肌、膈肌损伤),由英国牛津大学 Davies 教授惠赠(动物入境检疫许可证号为 AD44010011),饲养于原成都军区昆明总医院实验动物中心屏障系统环境实验室[SYXK(滇)2015-0011]。经过原成都军区昆明总医院伦理委员会批准开展动物实验研究(审批号:2016011 号)。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》、按照 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

C57 小鼠脐带间充质干细胞(mUCMSC)来自于作者所在云南省干细胞工程实验室细胞库,即复苏经免疫表型鉴定和诱导分化实验鉴定合格的第三代 mUCMSC 用于实验研究。Lenti 慢病毒载体液为上海吉满生物科技有限公司产品;培养基 DMEM/F12、胎牛血清、0.25% EDTA-胰蛋白酶为 Hyclone 公司产品;80i 荧光显微镜为 Nikon 公司产品。小动物活体成像仪 FluorVivo,为环亚生物科技公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 mUCMSC 的 GFP 转染标记

按照前期建立的 mUCMSC 培养方法^[6],将鉴定合格冻存的第三代 mUCMSC 快速解冻,移至 50 mL 离心管内加入生理盐水充分混匀后离心,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液重悬后转移至多个

175 cm² 培养瓶中静置培养 24 h, 按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) MOI 值为 150 的剂量加入慢病毒载体共培养 72 h, 在荧光倒置显微镜下观察拍照。消化收集慢病毒载体共培养 72 h 的 mUCMSC, 加入生理盐水制成细胞浓度为每毫升 1.25×10^7 个的细胞悬液备用。

1.3.2 腹腔注射及活体成像观察

实验组 3 只 mdx 小鼠, 仰卧位固定, 酒精消毒腹壁后将其微微提起, 小心穿刺, 确保注射器针尖进入腹腔空隙但不进入肠管或其它脏器, 每只腹腔一次性注射 0.4 mL 生理盐水细胞悬液 (含 5×10^6 个 GFP 标记的第三代 mUCMSC), 对照组 2 只 mdx 小鼠对照仅注射 0.4 mL 生理盐水。在移植后 1 h、3 h、5 h、24 h、1 周用小动物活体成像仪观察小鼠腹壁注射细胞局部和腹腔荧光信号的分布, 并确定脐带间充质干细胞的清除速率。

1.3.3 膈肌组织学镜检观察

参照前期建立的方法^[7], 活体成像观察结束立即处死实验小鼠切取膈肌, 采集每只鼠膈肌的左、中、右 3 小块, 分别置于固定架上滴加包埋剂, 固化后每小块膈肌制作冰冻切片, 荧光显微镜下观察拍照, 计数 10 倍镜下每个视野内荧光信号点, 每小块膈肌计数 5 个视野, 每只鼠左、中、右 3 小块膈肌共计计数 15 个视野。比较分析实验组和对照组之间荧光信号点数的差异。

1.4 统计学方法

以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示数据, 采用 SPSS 17.0 统计学软件分析, 两组数据间比较用 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 视为有统计学意义。

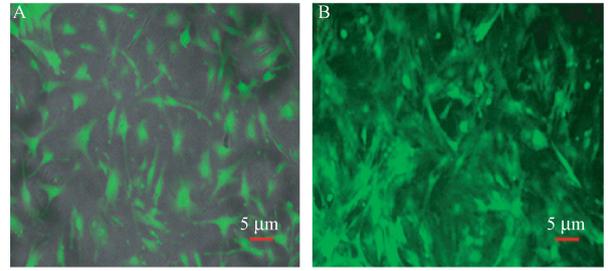
2 结果

2.1 GFP 转染标记的 mUCMSC

按照最佳 MOI 值 150 的剂量加入慢病毒载体与 mUCMSC 共培养 72 h 后, 荧光显微镜下观察, 可见大量贴壁生长细胞呈现明亮的绿色荧光 (图 1A)。这些散发绿色荧光的 mUCMSC, 用 0.25% trypsin-EDTA 消化传代 3 代, 荧光亮度无明显衰减 (图 1B)。

2.2 体内 mUCMSC 的分布和降解

0.4 mL 生理盐水悬浮的 5×10^6 个 GFP 标记的 mUCMSC, 一次性注射到 mdx 小鼠腹腔后 1 h、3 h、5 h, 在小动物活体成像仪绿色荧光通道下观察到腹壁下注射细胞的部位有明亮的绿色荧光集中分布,



注: A: GFP 标记的 mUCMSC; B: 传代的 GFP 标记的 mUCMSC。

图 1 慢病毒载体转染标记的 mUCMSC

Note. A, mUCMSC-labeled GFP. B, Passaged mUCMSC-labeled GFP.

Figure 1 mUCMSC-labeled by GFP lentiviral vector transfection

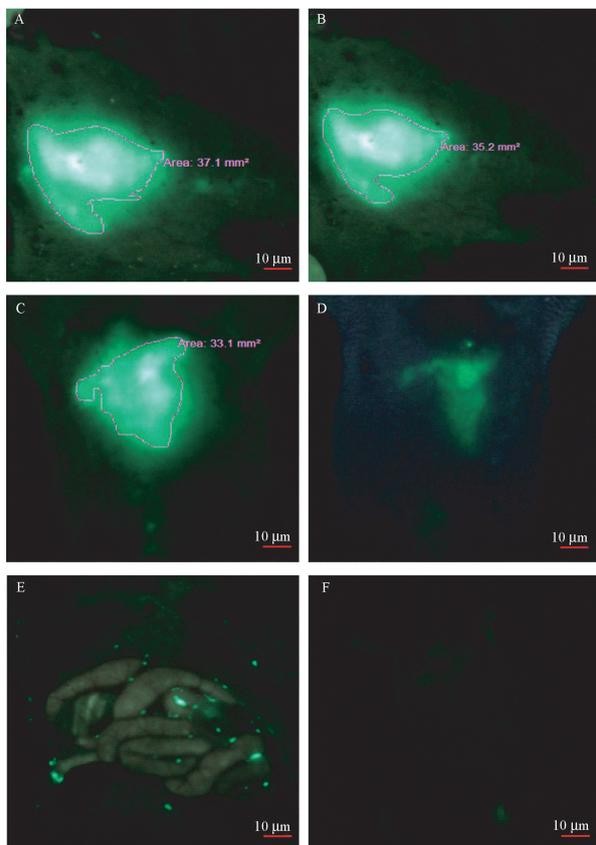
只是荧光轮廓不断缩小 (图 2A、2B、2C)。24 h 后荧光强度明显变弱 (图 2D), 2 只 mdx 小鼠甚至不能确定轮廓。一周后, 所有小鼠腹部均观察不到荧光信号。为进一步观察腹腔内部绿色荧光信号的分布, 将 mdx 小鼠处死后剪开腹壁, 暴露整个腹腔脏器, 可在小动物活体成像仪绿色荧光通道下观察到腹壁内侧和器官表面有少许荧光点分布 (图 2E), 而注射未标记 GFP 的 mUCMSC 的对照小鼠检测不到典型的明亮绿色荧光的存在 (图 2F)。为了观察 GFP 标记的 mUCMSC 在 mdx 小鼠体内的降解变化趋势, 把实验组 ($n=3$) 确定的荧光轮廓测定出平均荧光面积, mUCMSC 注射后 1 h、3 h、5 h 平均荧光面积依次为 (36.5 ± 2.3) mm²、(33.8 ± 2.6) mm²、(30.9 ± 3.5) mm²。把确定不了荧光轮廓时和以后的平均荧光面积视为 0, 就可发现, 荧光面积随着细胞注射后的时间延长呈不断缩减的趋势 (图 2G), 尤其是细胞注射后 5 h 后呈现快速消减趋势。

2.3 镜检观察膈肌内 mUCMSC 的分布

注射细胞 1 周后的 mdx 小鼠膈肌冰冻切片内, 在荧光显微镜下, 每只鼠的左、中、右部位均可在膈肌横断面观察到少许绿色荧光信号散在分布 (图 3A, 3A-1, 3A-2), 对照组小鼠膈肌横断面观察不到绿色荧光信号 (图 3B)。按照每个部位 5 个视野, 每只鼠共计计数 15 个视野 ($n=15$) 计算, 每只鼠膈肌内有 (2.9 ± 2.2) 个绿色荧光信号, 与未注射细胞的对照组有显著差异 ($P < 0.05$) (图 3C)。

3 讨论

建立稳定可靠的体内示踪技术, 是动态监测移植的间充质干细胞在体内的迁移分布、开展间充质干细胞药代动力学研究的前提^[8]。本研究显示: 按



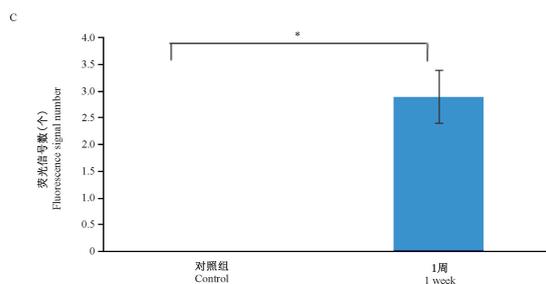
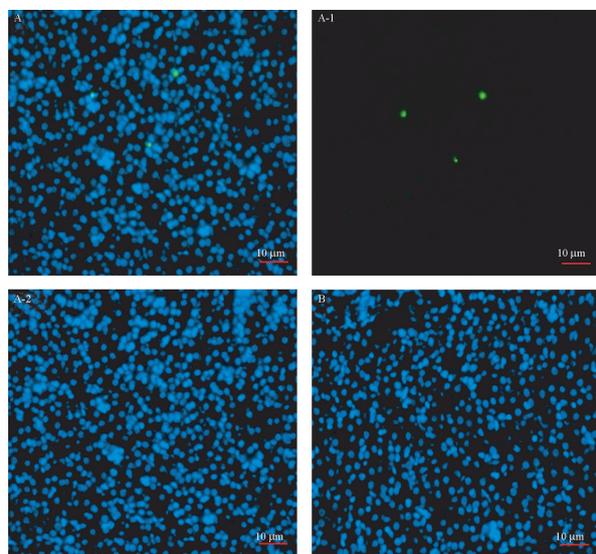
注:A:注射后 1 h;B:注射后 3 h;C:注射后 5 h;D:注射后 24 h;E:注射后 1 周(168 h)腹腔内脏;F:对照 mdx 小鼠;G:变化趋势图。

图 2 局部注射 GFP-mUCMSC 后 mdx 小鼠腹部荧光信号分布及变化趋势分析

Note. A, 1 h after injection. B, 3 h after injection. C, 5 h after injection. D, 24 h after injection. E, Abdominal cavity 1 week after injection. F, Control mdx mice. G, Change tendency chart.

Figure 2 Fluorescence signal distribution and change tendency analysis in the abdomen of mdx mice after local GFP-mUCMSC injection

照最佳 MOI 值 150 的剂量加入慢病毒载体与 mUCMSC 共培养,可以成功使 mUCMSC 转染 GFP,在特定波长光照条件下发出绿色荧光,传代 3 代,荧光亮度不会明显衰减,这暗示 GFP 转染标记的 mUCMSC 可用于体内短期示踪。GFP 基因转染标记的细胞,在特定波长的光照激发下就会发出绿色



注:A:实验组 mdx 小鼠(合成图);A-1:GFP;A-2:DAPI;B:对照 mdx 小鼠;C:比较分析图。* $P < 0.05$

图 3 注射后 1 周 mdx 小鼠膈肌组织内荧光信号分布镜检观察及比较分析

Note. A, Experiment group mdx mice (merged). A-1, GFP. A-2, DAPI. B, control mdx mice. C, Comparison analysis chart. * $P < 0.05$

Figure 3 Fluorescence signal distribution observed by fluorescence microscope in the diaphragm of mdx mice at 1 week post injection and comparison analysis

荧光^[9],结合活体成像技术,实现了对植入细胞的适时动态观察。

静脉途径给药是间充质干细胞治疗常用的方法,但我们的前期研究发现静脉注射大量间充质干细胞治疗 mdx 小鼠极易引发小鼠栓塞死亡^[7]。腹腔注射法操作简单,不存在引发肺栓塞的危险,而且腹腔注射与静脉注射间充质干细胞的效果没有差别^[10-11],本研究显示:一次性腹腔注射大剂量细胞给腓肠肌、膈肌等肌组织进行性变性坏死的 mdx 小鼠,1 h 后可在注射细胞的腹壁下观察到明亮的绿色荧光集中分布,随后荧光面积逐渐缩小,24 h 后荧光面积大幅缩小,荧光强度明显变弱,一周后,腹部观察不到荧光信号,这与人脐带间充质干细胞在裸鼠体内研究的报道类似^[12]。为了进一步观察腹

腔内部绿色荧光信号的分布,本研究将 mdx 小鼠处死后剪开腹壁,暴露整个腹腔脏器,可在小动物活体成像仪绿色荧光通道下观察到腹壁内侧和器官表面有少许荧光点分布。这表明:注射到 mdx 小鼠腹腔内的 GFP 标记的 mUCMSC 在 24 h 之内细胞数量在不断减少或者细胞浓度在不断降低。C57 小鼠来源的 mUCMSC,转染 GFP 不会影响其免疫原性低的生物学特性。因此,注射同种异体 mUCMSC 到与 C57 小鼠同源的 mdx 小鼠腹腔,不会很快被 mdx 小鼠免疫细胞清除,注射到腹腔的细胞在 mdx 小鼠体内可能存在 1 周,24 h 内腹壁荧光信号大幅减弱的主要原因是细胞浓度降低所致,很有可能与肠管蠕动造成的被动运动有关,也可能是受到全身肌肉损伤而产生的趋化因子的招募作用而形成的主动运动有关。活体成像技术不能观察到注射细胞后 1 周的 mdx 小鼠腹腔存在明显荧光时,采用荧光显微镜检测方法还可在 mdx 小鼠膈肌内观察到荧光信号的存在,表明擅长于整体观察的小动物活体成像仪检测 GFP 荧光信号的灵敏度远低于擅长于微观观察的荧光显微镜,注射到腹腔的 mUCMSC 可以进入膈肌,其迁移机制可能与 mdx 小鼠的损伤膈肌释放的炎症因子的靶向招募有关^[13-14],具体迁移及作用机制有待于进一步深入研究。

参考文献:

[1] Mennan C, Garcia J, Roberts S, et al. A comprehensive characterisation of large-scale expanded human bone marrow and umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 99.

[2] 韩立, 惠利健, 潘国宇. 细胞的命运:间充质干细胞的药代动力学 [J]. *中国细胞生物学报*, 2018, 40(6): 857-866.

[3] Shashkova S, Leake MC. Single-molecule fluorescence microscopy review: shedding new light on old problems [J]. *BioSci Rep*, 2017, 37(4): 1-19.

[4] 王峰, 田小丽, 马诗静, 等. 绿色荧光蛋白标记的 Lewis 肺癌小鼠原位模型的建立及鉴定 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2018, 39(5): 689-692, 778.

[5] Sienkiewicz D, Kulak W, Okurowska-Zawada B, et al. Duchenne muscular dystrophy: current; cell therapies [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2015, 8(4): 166-177.

[6] 朱慧, 叶莉, 何洁, 等. 小鼠脐带间充质干细胞的体外诱导分化 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(6): 622-627.

[7] Pang R, Zhu X, Geng J, et al. In vitro and in vivo analysis of human fibroblast reprogramming and multipotency [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2015, 20(3): 404-417.

[8] Kim JE, Kalimuthu S, Ahn BC. In vivo cell tracking with bioluminescence imaging [J]. *Nucl Med Mol Imaging*, 2015, 49(1): 3-10.

[9] Rajabathar JR, Munusamy MA, Al-Lohedan HA. Preparation, textural and photoluminescence characterization of green fluorescence protein-immobilised Ga-ZnO (GZO)-nanocomposites [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2016, 165: 202-212.

[10] Wang M, Liang C, Hu H, et al. Intraperitoneal injection (IP), Intravenous injection (IV) or anal injection (AI)? Best way for mesenchymal stem cells transplantation for colitis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30696.

[11] Bazhanov N, Ylostalo JH, Bartosh TJ, et al. Intraperitoneally infused human mesenchymal stem cells form aggregates with mouse immune cells and attach to peritoneal organs [J]. *Stem cell Res Ther*, 2016, 7: 27.

[12] 王伟, 陈超, 刘延明, 等. 应用小动物活体成像追踪观察 EGFP 标记的间充质干细胞 [J]. *中国细胞生物学报*, 2016, 38(2): 185-192.

[13] Meirelles LS, Fontes AM, Covas DT, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20(5-6): 419-427.

[14] Sala E, Genua M, Petti L, et al. Mesenchymal stem cells reduce colitis in mice via release of TSG6 independently of their localization to the intestine [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(1): 163-176.

[收稿日期] 2019-04-26