

鄢东海,向雪萍,逢永成,等. 大鼠胚胎内注射 hUCMSCs 在肝内存活和肝源分化研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(4): 14-18,85.

Yan DH, Xiang XP, Pang YC, et al. Intrahepatic survival and hepatic differentiation in rat embryos injected with hUCMSCs [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(4): 14-18,85.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.04.003

大鼠胚胎内注射 hUCMSCs 在肝内存活和肝分化研究

鄢东海^{1,2}, 向雪萍³, 逢永成², 谭显庆², 郑开恢², 田川¹, 李自安¹, 王强¹, 庞荣清^{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, 昆明 650032; 2. 巴东县人民医院, 湖北 巴东 444300; 3. 巴东县中医医院, 湖北 巴东 444300)

【摘要】 目的 观察大鼠胚胎期注射绿色荧光蛋白(GFP)标记的人脐带间充质干细胞(GFP-hUCMSCs)在SD大鼠肝中存活和肝分化,探索在胚胎发育期建立人-大鼠嵌合体肝的可行性。**方法** 运用携带绿色荧光蛋白的慢病毒转染标记人脐带间充质干细胞,然后注射到实验组大鼠胚胎。胎鼠出生后,制作冰冻切片观察GFP-hUCMSCs在肝组织的迁移和分布,同时免疫组织化学法检测人相关蛋白在鼠肝内的表达。对照组注射等体积生理盐水。**结果** 实验组胎鼠出生45 d、75 d、120 d的肝组织内检测到GFP信号的分布,对应肝组织内可检测到人肝细胞相关蛋白ALB、HNF3 β 和HNF4 α 的表达,但120 d大鼠含量极少、部分甚至检测不到。对照组为阴性。**结论** 胚胎期注射hUCMSCs的胎鼠出生75 d的肝内仍可检测到GFP信号的存在和人肝细胞相关蛋白ALB、HNF3 β 和HNF4 α 的表达,且随时间延长而呈现逐渐减少的趋势。

【关键词】 脐带间充质干细胞;分化;胚胎注射;肝细胞相关蛋白;肝

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)04-0014-05

Intrahepatic survival and hepatic differentiation in rat embryos injected with hUCMSCs

YAN Donghai^{1,2}, XIANG Xueping³, PANG Yongcheng², TAN Xianqing², ZHENG Kaihui², TIAN Chuan¹, LI Zian¹, WANG Qiang¹, PANG Rongqing^{1*}

(1. the Cell Biological Therapy Center of 920th Hospital of Joint Logistics Support Force, the Integrated Engineering Laboratory of Cell Biological Medicine of State and Regions, Kunming 650032, China.

2. Badong County People's Hospital, Badong 444300. 3. Badong County Chinese Medicine Hospital, Badong 444300)

【Abstract】 **Objective** To observe the survival and liver differentiation of Green Fluorescent Protein (GFP) labeled human umbilical cord mesenchymal stem cells (GFP-hUCMSCs) in SD rats during the embryonic stage, to investigate the feasibility of establishing a human-rat chimeric liver in the embryonic stage of rats. **Methods** Lentiviral containing GFP gene was used to transfect and to label human umbilical cord mesenchymal stem cells, and then GFP-hUCMSCs were injected into the experimental group rat embryos. After embryonic rats birth, the Frozen liver sections were used, and the migration and distribution of the GFP-hUCMSCs were observed in the liver tissue. While the expression of human-related proteins in the rat liver were detected by immunohistochemical method. The control group was injected with an equal volume of normal saline. **Results** GFP signal were detected in liver tissue from the experimental group at 45 d,

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(31970515);院内科技计划项目(2019YGA05)。

【作者简介】 鄢东海(1987—),男,巴东县人民医院住院医师(硕士研究生)。E-mail: 1072346722@qq.com

【通信作者】 庞荣清(1971—),男,主任医师/教授,硕士生导师,主要研究方向:干细胞与再生医学。E-mail: pangrq2000@aliyun.com

75 d, and 120 d after birth. Correspondingly, expression of the human hepatocyte-related proteins ALB, HNF3 β , and HNF4 α was detected in the liver tissue, but these proteins content at 120 d was extremely small, and partly not detected. The control group was negative. **Conclusions** In embryonic rats injected with hUCMSCs, the presence of GFP signal and the expression of the human hepatocyte-related proteins ALB, HNF3 β , and HNF4 α can be detected in the liver at 75 d after birth, and gradually decrease over time.

[Keywords] umbilical cord mesenchymal stem cells; differentiation; embryo injection; hepatocyte-associated protein; liver

人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUMSCs) 易于取材、细胞增殖活性强,具有免疫调节特性等优点,使其成为再生医学和组织工程领域应用十分广泛的细胞源,且在临床可治疗诸多疾病,这或许是细胞治疗^[1-2]新时期的开端。但是,植入细胞在体内如何靶向迁移、定向分化等研究还不明确。绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因转染标记是常用的体内示踪技术方法,用 GFP 标记人胎盘来源的间充质干细胞可在体外分化成肝细胞^[3]。胚胎期属于个体发育的特殊时期,胚胎期注射 hUMSCs 能否向肝分化具有重要的意义,可为转化医学提供更充足的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

所用动物为 SPF 级 SD 大鼠。2 只雄性 SD 大鼠和 5 只雌性 SD 大鼠,体重 180~220 g,70~84 d 日龄,均购于昆明医科大学 [SCXK (滇) K2015-0002],饲养于第九二〇医院屏障系统环境动物实验室 [SYXK (军) 2017-0052]。经第九二〇医院伦理委员会的批准 (2017027),使用实验动物时严格按照 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 细胞

人脐带间充质干细胞 (hUCMSCs) 由第九二〇医院细胞生物治疗中心提供。

1.2 主要试剂与仪器

新西兰热灭活小牛血清 (商品货号: 26170043)、DMEM/F-12 培养基 (商品货号: C11330500BT) 和 0.25% 胰蛋白酶溶液 (商品货号: 252000-056) 均购自美国 Gibco 公司;携带 GFP 基因的慢病毒购自吉满生物公司 (商品编号: GM100101-2);免疫组织化学染色用单抗 Rabbit-anti-human HNF4 α (商品编号: ab181604)、Rabbit-anti-human HNF3 β (商品编号: ab180710) 和 Rabbit-

anti-human ALB (商品货号: ab2073227) 均购自英国 Abcam 公司。Heal Force CO₂ 细胞培养箱购自上海力申科学仪器有限公司;IX 70-121 倒置相差显微镜购自 Olympus 公司;正置荧光显微镜 NIKON ECLIPSE C1、成像系统 NIKON DS-U3 均购自日本尼康公司。

1.3 实验方法

1.3.1 hUCMSCs 的 GFP 转染标记

根据说明书并参照慢病毒转染的技术方法^[4]标记 hUCMSCs,即将鉴定合格的 P3 代 hUCMSCs 转移到 175 cm 的细胞培养瓶中静置培养 24 h 后,按转染复数 (multiplicity of infection MOI) MOI = 50 的剂量在每瓶细胞中滴加携带 GFP 慢病毒液共培养 72 h,在荧光倒置显微镜下观察,消化并收集标记的细胞,即 GFP-hUCMSCs 用于传代培养或悬浮于生理盐水中制成 1×10^7 cells/mL 的单细胞悬液避光保存备用。

1.3.2 SD 大鼠胚胎注射 GFP-hUCMSCs

按雄雌比 1:2 和 1:3 比例合笼,早、中、晚观察雌鼠阴栓情况,发现阴栓计为孕龄 0.5 d,并分笼精心喂养,发现阴栓第 15 天时行胚胎注射。注射方法为切开孕鼠盆腔腹壁,暴露孕鼠“Y”字形双子宫,无菌操作,保持胚胎湿润,透过透明子宫壁给每只胎鼠上腹部快速注射 0.1 mL 含 10^6 个 GFP-hUCMSCs。注射相同体积生理盐水的同龄胎鼠作为阴性对照。注射完毕后,分层缝合切口,消毒后将孕鼠单独放在有无菌敷料的鼠笼待其苏醒,精心饲养观察,待胎鼠出生后随机分组实验。

1.3.3 肝组织冰冻切片 GFP 阳性细胞检测

新生大鼠出生 45 d、75 d、120 d 时,手术切取少许肝组织。制作冰冻切片,滴加 DAPI 染色后直接在正置荧光显微镜观察 GFP 阳性细胞的分布并拍照。

1.3.4 肝组织中肝细胞特异蛋白免疫组织化学染色分析检测

新生大鼠出生 45 d、75 d、120 d 时,随机切取适

量肝组织,迅速用质量分数 4% 多聚甲醛固定后制石蜡切片,经脱蜡水化、抗原修复。抗体孵育:一抗孵育 (Rabbit-anti-human HNF4 α 、Rabbit-anti-human HNF3 β 和 Rabbit-anti-human ALB),在湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 缓冲液(0.01 mol/L)漂洗 3 次;二抗孵育每张滴加抗兔生物素 100 μ L,常温孵育 1 h,PBS 缓冲液(0.01 mol/L)洗涤 3 次,每次 3 min,每张滴加 HRP 标记链亲和素 50 μ L,常温孵育 10 min。PBS 缓冲液(0.01 mol/L)清洗 3 次,每次 3 min,每张滴加 DAB 显色液 50 μ L,常温孵育 10 min,然后用自来水冲洗约 10 min,苏木素复染 2 min,并加盐酸酒精分化 2 s,自来水洗净染液。脱水、透明以及封片,最后用显微镜观察并拍照。

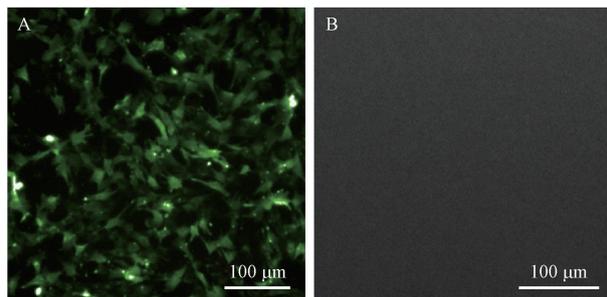
2 结果

2.1 GFP 转染标记 hUCMSCs

按转染复数 MOI=50 的剂量,将鉴定合格的 P3 代细胞与携带 GFP 慢病毒液共培养 72 h。在荧光倒置显微镜下可清楚看到大量贴壁生长的细胞呈现较亮的绿色荧光信号(见图 1A),未加入 GFP 慢病毒液共培养的对照组细胞观察不到绿色荧光表达(见图 1B)。

2.2 各组肝中 GFP 阳性细胞的分布情况

胚胎期注射 GFP-hUCMSCs 的实验组大鼠肝组织制作冰冻切片,在荧光显微镜下可观察到绿色荧光信号的存在。其中,45 d 较多,个别鼠特别多(图 2A、2B),75 d 减少(图 2C),120 d 只可见极少量荧光信号(图 2D),对照组则观察不到 GFP 阳性细胞分布(图 2E)。

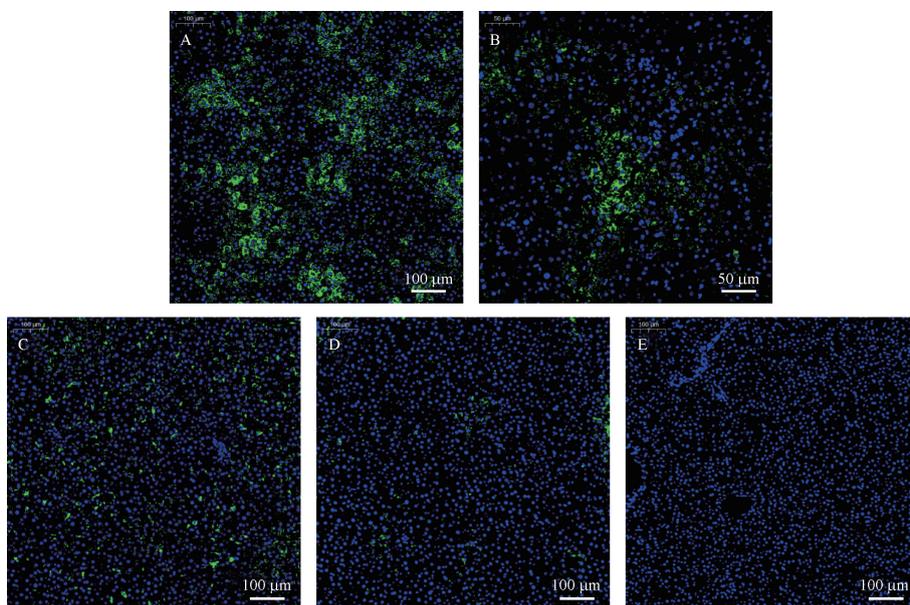


注:A:与 GFP 慢病毒共培养的 hUCMSCs;B:没有共培养的对照 hUCMSCs。

图 1 转染 GFP 基因标记的 hUCMSCs

Note. A, hUCMSCs co-cultured with GFP lentivirus. B, Control hUCMSCs without co-culture.

Figure 1 Transfection of GFP gene-tagged hUCMSCs



注:A:45 d 组 1 只大鼠 GFP 阳性分布较多;B:45 d 组大鼠 GFP 阳性分布;C:75 d 大鼠 GFP 阳性分布;D:120 d GFP 阳性分布;E: 阴性对照组。

图 2 不同组 SD 大鼠肝组织冰冻切片内 GFP 信号观察

Note. A, The GFP positive distribution of 1 rat in the 45 d group was more. B, the positive distribution of GFP in the 45 d group. C, the positive distribution of GFP in the 75 d rat. D, 120 d GFP positive distribution. E, Negative control group.

Figure 2 Observation of GFP signal in frozen sections of liver tissue of SD rats in different groups

2.3 各组肝中人肝细胞相关蛋白的检测情况

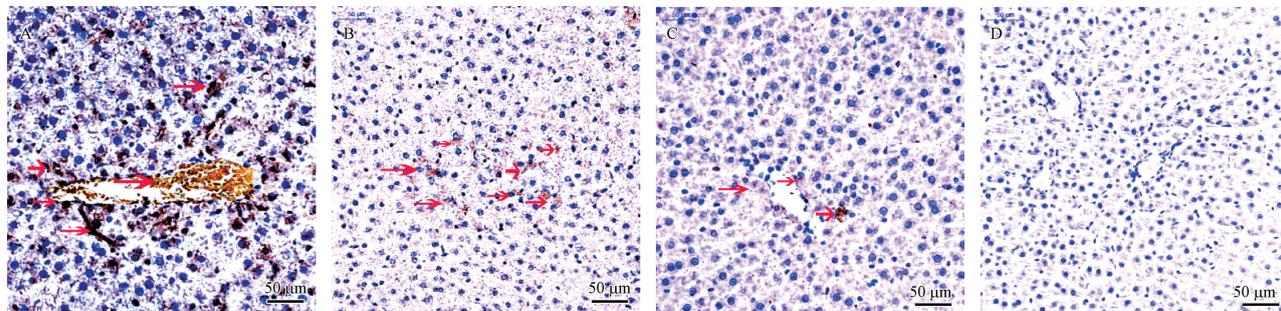
取各组大鼠肝组织制作石蜡切片,抗原修复,应用免疫组化法,观察人 ALB、HNF4 α 和 HNF3 β 蛋白表达情况显示相关蛋白表达随机分布,血管周围有相对分布较多的趋势。如图:实验组大鼠肝组织可检测到人 ALB (见图 3)、HNF4 α (见图 4) 和 HNF3 β (见图 5) 蛋白的表达,对照组大鼠肝组织未检测到这些蛋白的表达(见图 3、4、5D)。出生 45 d 大鼠肝内 ALB、HNF4 α 和 HNF3 β 蛋白的表达量总体较多,出生 75 d 的表达量总体较少,出生 120 d 的表达极少、甚至检测不到 ALB、HNF4 α 和 HNF3 β 蛋白的表达。同预期结果,对照组大鼠肝组织未检测到这些人源蛋白的表达。如图中箭头所示,棕黄色或褐色为相关蛋白阳性表达。

3 讨论

嵌合现象在自然界广泛存在,而在早期胚胎中

更为普遍。接受骨髓移植的患者体内存在供受体来源细胞相互移居长期共存的嵌合现象^[5-6]。胚胎期注射有助于嵌合体的形成和植入细胞的分化,国内外科学家应用胚胎注射法成功建立了人-绵羊造血干细胞嵌合体模型^[7]和人-山羊肝嵌合体模型^[8]。建立大型动物嵌合体模型的操作复杂,设备要求较高,如何在生理条件下建立可靠易行的技术方法和动物模型势在必行。本研究首次探索运用大鼠胚胎发育期免疫系统不成熟的自然条件,研究建立人-鼠嵌合体肝的可行性。

UCMSC 在分化潜能^[9-10]、免疫原性、来源、伦理问题等方面都有独特的优势,已成为再生医学研究领域重要的种子细胞。选择 hUCMSCs 构建模型,有利于 hUCMSCs 在治疗人类疾病中的应用,从而为转化医学提供更多理论支持。携带绿色荧光蛋白(GFP)慢病毒载体液标记细胞的方法追踪细胞^[3,11]在动物体内的分布简便易行,GFP 标记高效、无毒

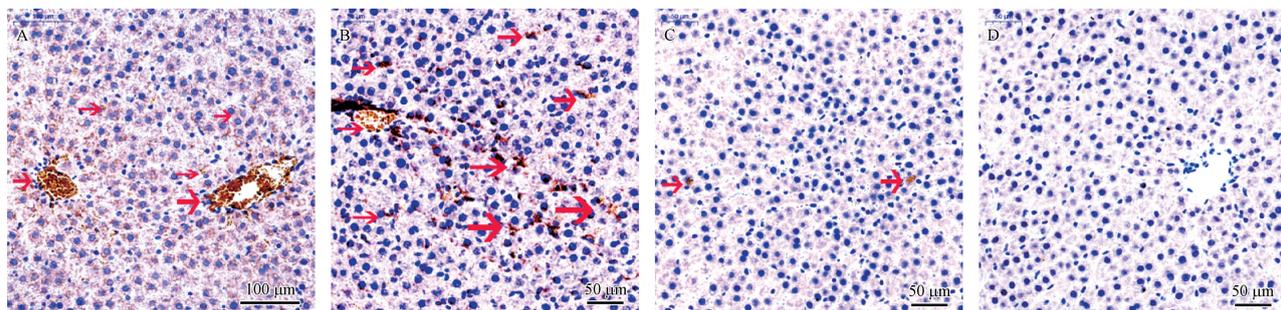


注:A:45 d 大鼠肝内人 ALB 较多广泛表达;B:75 d 大鼠肝内 ALB 零星较少表达;C:120 d 大鼠肝内人 ALB 微弱表达;D:阴性对照。红色箭头显示 ALB 表达。

图 3 不同组 SD 大鼠肝组织中 人 ALB 蛋白免疫组织化学染色分析

Note. A, 45 d of intrahepatic human ALB is more widely expressed. B, 75 d of intrahepatic ALB sporadic expression is less. C, 120 d of intrahepatic ALB is weak Expression. D, Negative control. Red arrows show ALB expression.

Figure 3 Immunohistochemical staining analysis of human ALB protein in liver tissues of SD rats of different groups

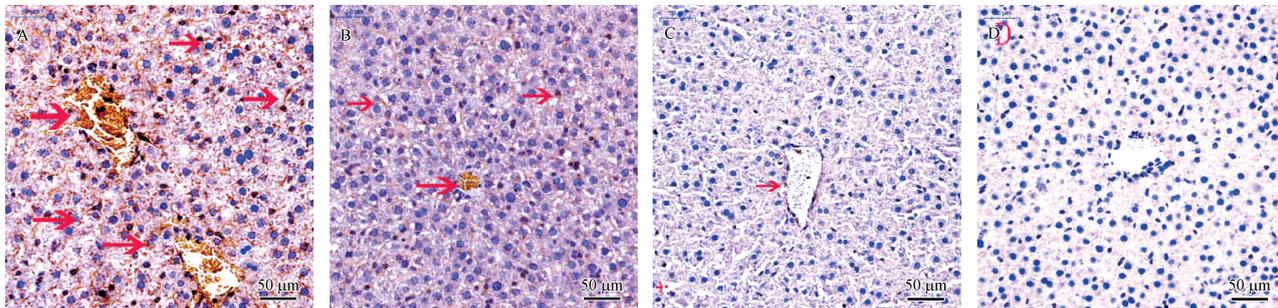


注:A:45 d 大鼠肝内人 HNF4 α 广泛表达;B:75 d 大鼠肝内人 HNF4 α 表达减少;C:120 d 大鼠肝内几乎检测不到人 HNF4 α 表达;D:阴性对照。红色箭头显示 HNF4 α 表达。

图 4 不同组 SD 大鼠肝组织中 人 HNF4 α 蛋白免疫组织化学染色分析

Note. A, 45 d rat liver HNF4 α was widely expressed. B, 75 d of rat liver HNF4 α expression decreased. C, 120 d rat liver was almost undetectable human HNF4 α Expression. D, Negative control. Red arrows show HNF4 α expression.

Figure 4 Immunohistochemical staining analysis of human HNF4 α protein in liver tissues of SD rats of different groups



注:A:45 d 大鼠肝内人 HNF3 β 的分布较多;B:大多 75 d 大鼠肝内人 HNF3 β 表达量较低;C:多数 120 d 大鼠肝内检测不到人 HNF3 β 表达;D:阴性对照。红色箭头显示 HNF3 β 表达。

图 5 不同组 SD 大鼠肝组织中 HNF3 β 蛋白免疫组织化学染色分析

Note. A, The distribution of HNF3 β in the liver of rats was more than 45 d. B, the expression of HNF3 β in the liver of rats was lower in most of the 75 d. C, the liver of most 120 d human HNF3 β expression was not detected. D, Negative control. Red arrows show HNF3 β expression.

Figure 5 Immunohistochemical staining analysis of human HNF3 β protein in liver tissues of SD rats of different groups

副作用,时间较长,便于观察,是一种良好的干细胞标记技术。组织制作冰冻切片,在荧光显微镜下直接观察绿色荧光信号的分布从而检测植入已标记细胞的分布。本实验用携带 GFP 的慢病毒载体液转染标记 hUCMSCs (即 GFP-hUCMSCs),便于追踪人源细胞在肝内的分布。

干细胞在动物模型体内存活和分化是模型成功与否的关键。冰冻切片发现实验组大鼠肝组织中 45 d 绿色荧光信号较多,75 d 的明显减少,120 d 时只可观察到极少量荧光信号的存在;对照组肝组织中未检测到绿色荧光信号。从而证明胚胎期注射的 GFP-hUCMSCs 可迁移到肝组织。肝富集转录因子(liver-enriched transcription factors)主要存在于肝并调控肝特异性基因的表达,在调控器官发育时发挥关键作用,促进肝代谢^[12],其中 HNF3 β 调控 HNF4 α 等转录因子在内的许多基因的转录,而 HNF4 α 属二聚体转录因子,是一种锌指结构蛋白,可控制多达 60% 的肝基因^[13],是肝特异性基因表达的主要调节因子。且 HNF4 α 过表达的肝祖细胞可作为细胞移植的最佳候选者^[14]。HNF4 α 在成熟肝细胞中的表达量最高,对肝细胞分化的调控、肝的形成和肝细胞生物学功能的维护都起重要作用,诸如肝癌等^[14]许多肝疾病与 HNF4 α 表达量的异常有关。白蛋白(ALB)主要存在于血浆中,大多在肝内合成并分泌,常作为鉴定肝细胞功能正常与否的经典指标。采用免疫组化染色分析法,在出生 45、75 d 的实验组大鼠肝中可检测到 HNF3 β 、HNF4 α 和 ALB 蛋白的表达,出生 120 d 的大鼠只能检测到人源相关蛋白的微弱表达甚至完全检测不到。从而证明植入细胞在大鼠肝体内得到进一步分化的机会。

综上所述可知胚胎期注射 GFP-hUCMSCs 能够迁移到胎鼠肝,在胎鼠出生后的肝内存活并在至少 45 d 时间内得到进一步生长发育的机会,同时形成两种来源细胞相互共存的嵌合状态。但随着大鼠出生时间的延长,人源细胞数量明显减少,从侧面说明人源细胞在两种细胞生存竞争中很快处于不利地位,这可能与大鼠免疫系统的发育和植入细胞的分化有关,但其具体的调控机制有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Sheridan C. First off-the-shelf mesenchymal stem cell therapy nears European approval [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(3): 212-214.
- [2] 付旭峰,陈冰冰,严亚萍,等. 动物模型在间充质干细胞治疗慢性肝病临床前研究的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 102-106.
- [3] Yu J, Su X, Zhu C, et al. GFP labeling and hepatic differentiation potential of human placenta-derived mesenchymal stem cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(6): 2299-2308.
- [4] 余璞,龙海,霍金龙,等. 体外传代对版纳微型猪骨髓间充质干细胞绿色荧光蛋白表达的影响 [J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2016, 6(6): 363-368.
- [5] Wilson FD, Konrad PN, Greenberg BR, et al. Cytogenetic studies on bone marrow fibroblasts from a male-female hematopoietic chimera. Evidence that stromal elements in human transplantation recipients are of host type [J]. Transplantation, 1978, 25(2): 87-88.
- [6] Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. Haematopoietic chimera in man after allogenic (homologous) bone-marrow transplantation [J]. Br Med J, 1963, 2(5373): 1633-1635.