

何宏星,廖乃顺. 基于生物正交点击化学修饰吲哚菁绿用于脂肪间充质干细胞活体示踪的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 993-998.

He HX, Liao NS. *In vivo* tracking of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells labeled with indocyanine green using bio-orthogonal click chemistry [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 993-998.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.08.003

基于生物正交点击化学修饰吲哚菁绿用于脂肪间充质干细胞活体示踪的实验研究

何宏星¹, 廖乃顺^{2*}

(1. 福建医科大学实验动物中心, 福州 350004; 2. 福建医科大学孟超肝胆医院, 福建省孟超肝胆技术联合创新重点实验室, 福州 350025)

【摘要】 目的 探究生物正交点击化学修饰可否用于脂肪间充质干细胞(ADSC)的吲哚菁绿(ICG)标记及活体示踪研究。**方法** 收集小鼠脂肪组织进行ADSC的分离与培养, 分别添加Ac4ManNAz、DBCO-ICG进行生物正交点击化学反应, 评估该方法对ADSC细胞活性的影响, 并利用共聚焦显微镜观察ADSC的ICG标记情况; 将标记ICG的ADSC移植到急性肝损伤小鼠体内, 利用近红外二区荧光成像开展ADSC的活体示踪研究, 收集肝组织进行ADSC归巢性分析; 最后, 评估生物正交点击化学修饰对ADSC移植治疗急性肝损伤疗效的影响。**结果** 生物正交点击化学可将ICG探针成功地修饰于ADSC细胞内, 且不影响ADSC的细胞活性; 标记ICG的ADSC移植到体内后主要分布、定位在肝组织内, 说明ADSC具有肝向归巢性; 生物正交点击化学修饰不影响ADSC改善急性肝损伤小鼠肝功能、减少肝细胞坏死的疗效。**结论** 生物正交点击化学可用于ADSC的ICG探针标记及活体示踪研究。

【关键词】 生物正交点击化学; 吲哚菁绿; 脂肪间充质干细胞; 活体示踪

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 08-0993-06

In vivo tracking of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells labeled with indocyanine green using bio-orthogonal click chemistry

HE Hongxing¹, LIAO Naishun^{2*}

(1. Laboratory Animal Center, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China. 2. the United Innovation of Mengchao Hepatobiliary Technology Key Laboratory of Fujian Province, Mengchao Hepatobiliary

Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350025)

Corresponding author: LIAO Naishun. E-mail: liaons046@163.com

【Abstract】 Objective To explore the use of bio-orthogonal click chemistry indocyanine green (ICG) labeling of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSC) and *in vivo* cell tracking. **Methods** ADSCs were isolated and cultured, and then incubated with N-azidoacetylmannosamine-tetraacylated (Ac4ManNAz) and Dibenzocyclooctyne-indocyanine green (DBCO-ICG) using bio-orthogonal click chemistry, and their cell viability was evaluated. ICG labeling was confirmed by laser confocal microscopy imaging. After ICG labeling, *in vivo* ADSC tracking was performed by near-infrared II fluorescence imaging in acute liver injured mice. Liver tissue sections were also collected to analyze ADSC homing. Moreover, the therapeutic effects of ICG-labeled ADSCs on serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) and on pathological changes were also evaluated. **Results** ICG labeling of ADSCs could be achieved by bio-orthogonal click chemistry. Notably, ADSC viability and their therapeutic effects on acute liver injury,

【基金项目】 福建省自然科学基金面上项目(2020J011152)。

Funded by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2020J011152).

【作者简介】 何宏星(1976—), 男, 实验师, 本科, 研究方向: 动物模型制作、动物实验。Email: 1311754246@qq.com

【通信作者】 廖乃顺(1988—), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向: 干细胞移植及活体示踪研究。Email: liaons046@163.com

including serum ALT and AST and hepatic morphology, were not affected by this method. Near-infrared II fluorescence imaging revealed the hepatic accumulation and homing of transplanted ADSCs *in vivo* and *ex vivo*. **Conclusions** Bio-orthogonal click chemistry may provide a promising new strategy for ADSC labeling and *in vivo* cell tracking.

[Keywords] bio-orthogonal click chemistry; ICG; mesenchymal stem cell; *in vivo* tracking

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脂肪来源的间充质干细胞 (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ADSC) 是一类来源于中胚层并具有多能性的成体干细胞, 具有易于体外扩增培养、组织修复功能、免疫调节功能等特性, 是当前组织工程与再生医学研究的重要种子细胞^[1-3]。研究表明, ADSC 移植可用于克罗恩病、骨病、肝病、移植物抗宿主病等疾病的治疗^[4-7]。然而, ADSC 作为一种“活”药物, 在进入临床应用之前, 应充分了解细胞移植进入体内后的分布、归巢特性, 对 ADSC 的疗效与生物安全性评价至关重要。因此, 开展 ADSC 的活体示踪研究具有重要的科学意义。

探针标记是开展细胞活体示踪研究的关键环节^[8-10]。大多数干细胞的示踪技术主要通过探针与细胞共孵育 (即细胞内吞途径) 进行细胞标记^[8], 这种方法需要标记的时间较长, 且需要在较高剂量下达到细胞活体示踪的目的 (容易带来细胞毒性)。生物正交点击化学修饰, 即利用细胞糖代谢工程在细胞表面暴露叠氮基团与携带炔基的探针通过点击化学反应、实现探针的快速标记, 该方法可用于细胞的快速标记, 具有操作简单、标记效率高、生物相容性好等特点, 是当前细胞活体示踪的主要细胞标记方法^[11-12]。吖啶菁绿 (ICG) 是一种已上市的红红外二区荧光染料 (发射波长在 700 ~ 1000 nm), 在临床上广泛可用于肝功能储备评估、肝癌手术导航等^[13-16]。本文将利用生物正交点击化学修饰实现 ADSC 的探针标记, 以急性肝损伤小鼠为模型, 开展 ADSC 活体示踪的实验研究, 探究 ADSC 的体内分布、归巢特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只 SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠, 5 ~ 6 周龄, 体重 18 ~ 20 g, 购买自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK (沪) 2022-0004】。动物饲养于福建医科大学实验动物中心 SPF 级屏障实验室内【SYXK (闽) 2022-0003】。环境温度 20 ~ 26℃, 相对湿度 40% ~ 70%, 光照/黑暗各 12 h, 昼夜交替;

动物自由摄食和饮水。实验前, 动物适应性饲养 1 周。实验获得福建医科大学孟超肝胆医院实验动物伦理中心审批 (MCHH-AEC-2022-01)。

1.1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清 (FBS)、 α -MEM 培养基、青-链霉素 (双抗)、0.25% 胰蛋白酶购自 Gibco 公司; HBSS (含钙、镁离子)、0.001 mol/L PBS 购自 Hyclone 公司; CCK8 检测试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 4% 多聚甲醛购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 生化试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 叠氮修饰甘露糖 (Ac4ManNAz)、对乙酰氨基酚、戊巴比妥钠、I 型胶原酶购自 Sigma-Aldrich 公司。

STR16R 型台式水平离心机 (Thermo, 美国), 18.2 M Ω .cm 电阻率去离子制水机 (Millipore, 美国), 微型磁力搅拌器 (IKA, 德国), Costar 细胞计数器 (Thermo, 美国), M5e 型多功能酶标仪 (Molecular Devices, 美国), LSM780 型激光扫描共聚焦显微镜 (Zeiss, 德国), 近红外二区小动物活体成像系统 (光映美, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 ADSC 分离与培养

无菌收集腹股沟处脂肪组织, 经 0.001 mol/L PBS 洗涤后, 将组织剪碎 (约 1 mm³) 后, 加入 0.1% I 型胶原酶 37℃、消化 60 min。加入完全培养基 (含 10% FBS、1% 双抗的 α -MEM 培养基) 终止消化, 经 100 μ m 筛网过滤, 收集细胞消化液。细胞悬液按 1×10^5 /mL 接种于 T75 培养瓶, 在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 隔 3 d 换液 1 次, 待细胞长满后, 按 1 : 3 比例进行细胞传代, 第 3 ~ 5 代 ADSC 用于后续实验。

1.2.2 生物正交点击化学修饰对 ADSC 活性的影响

细胞按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 贴壁 24 h 后, 添加 50 μ mol/L Ac4ManNAz 培养 24 h 后, 进行细胞换液, 并添加 25 μ mol/L DBCO-ICG 进行点击化学修饰。24 h 或 72 h 后, 添加 CCK8 工作液继续培养 1 h, 在 450 nm 处读取其吸光度值。

1.2.3 细胞的探针标记

细胞按 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,贴壁过夜后,添加 $50 \mu\text{mol/L}$ Ac4ManNAz 干预。24 h 后,收集 ADSC 细胞,加 $25 \mu\text{mol/L}$ DBCO-ICG 至 37°C 、30 min 进行点击化学反应。收集经生物正交点击化学修饰的 ADSC,经 0.001 mol/L PBS 洗涤 3 次后,加入 4%多聚甲醛固定 20 min,进行细胞核 DAPI 复染后,利用激光共聚焦扫描显微镜拍照观察 ADSC 的 ICG 标记情况。

1.2.4 细胞示踪

BALB/c 小鼠经一次性腹腔注射 300 mg/kg 对乙酰氨基酚,进行急性肝损伤造模。通过尾静脉注射标记 ICG 的 ADSC 细胞 (5×10^5 个/只),利用近红外二区小动物活体成像系统动态观察 ADSC 移植 30 min、1 d、3 d 后 ADSC 的体内归巢与分布情况。另外,为进一步评估 ADSC 的组织定位情况,收集经 ADSC 移植 3 d 后的肝组织,进行组织冰冻切片 ($10 \mu\text{m}$ 厚)、DAPI 染色,并利用激光共聚焦扫描显微镜拍照观察。

1.2.5 生物正交点击化学修饰对 ADSC 治疗急性肝损伤疗效的影响

将急性肝损伤小鼠随机分成模型组、ADSC 组、标记 ICG 的 ADSC (ADSC-ICG) 组,每组 5 只,并设立正常对照组 (5 只)。细胞治疗组通过尾静脉回输 ADSC 细胞 (5×10^5 个/只),对照组与模型组给予等体积生理盐水。细胞移植 2 d 后,进行标本采集与检测。1%戊巴比妥钠麻醉小鼠,眼眶静脉采血、血液经室温静置 30 min 后,经 4000 r/min 、 4°C 离心 10 min,收集细胞上清,并将血清样本送至福建医科大学孟超肝胆医院检验科,检测 ALT、AST 含量。收集肝组织,利用 4%多聚甲醛固定 24 h 后,分别进行乙醇、二甲苯脱水处理,石蜡包埋及切片、HE 染色拍照观察。

1.3 统计学分析

用 SPSS 18.0 软件、单因素方差分析、LSD 方法进行统计学分析,定量资料用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性。用 GraphPad Prism 7.0 进行柱状图作图。

2 结果

2.1 生物正交点击化学修饰不影响 ADSC 的细胞活性

与正常的 ADSC 组比较,经 Ac4ManNAz、DBCO-

ICG 的生物正交点击化学修饰 24、72 h 后,ADSC 的细胞活性无明显变化 (图 1),说明生物正交点击化学修饰的生物相容性好。

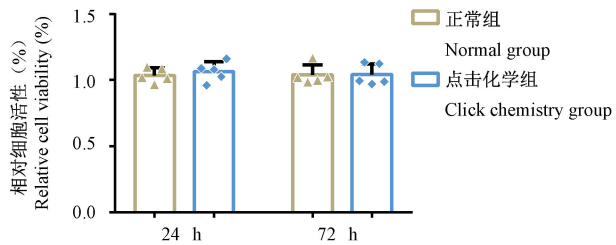


图 1 生物正交点击化学修饰后 ADSC 的细胞活性分析
Figure 1 ADSC viability after labeling with ICG by bio-orthogonal click chemistry

2.2 ADSC 的 ICG 标记

为进一步明确生物正交点击化学修饰是否可用于 ADSC 标记,以正常 ADSC 为对照,将标记 ICG 的 ADSC 进行共聚焦显微镜观察,如图 2 所示,正常 ADSC 无 ICG 荧光信号,而生物正交点击化学修饰后,ADSC 呈现明显的 ICG 荧光信号,说明生物正交点击化学修饰成功地将 ICG 标记 ADSC 细胞内。

2.3 ADSC 活体示踪

将标记 ICG 的 ADSC 经尾静脉移植到正常小鼠体内后,ADSC 细胞首先在肝富集,1 d 后,ADSC 的信号明显减少,随着时间的延长,ADSC 在移植 3 d 后未见明显的 ADSC 的信号,说明 ADSC 细胞在体内被逐步地清除;与正常组比较,将标记 ICG 的 ADSC 通过尾静脉注入到急性肝损伤小鼠体内,经尾静脉移植 1、3 d 后 ADSC 在肝组织富集的量明显增加,提示 ADSC 具有较好的归巢性;但是随着时间的延长,ADSC 在受损肝组织的荧光信号逐渐减少 (图 3),这可能是由于较少的 ADSC 能在受损肝组织中存活。

2.4 ADSC 的肝组织定位

为了进一步证实 ADSC 的肝向归巢性,收集经 ADSC (标记 ICG) 移植后的肝组织进行组织定位分析。如图 4 所示,标记 ICG 的 ADSC 主要分布在肝组织静脉周围,提示 ADSC 具有较好的肝向归巢性。

2.5 生物正交点击化学修饰 ICG 对 ADSC 移植治疗急性肝损伤肝功能的影响

如图 5 所示,与正常组比较,小鼠血清 ALT、AST 含量显著上升 ($P < 0.001$),说明小鼠的肝功能处于急性损伤状态;与模型组比较,经 ADSC 治疗后血清 ALT、AST 含量显著性下调 ($P < 0.01$),提示

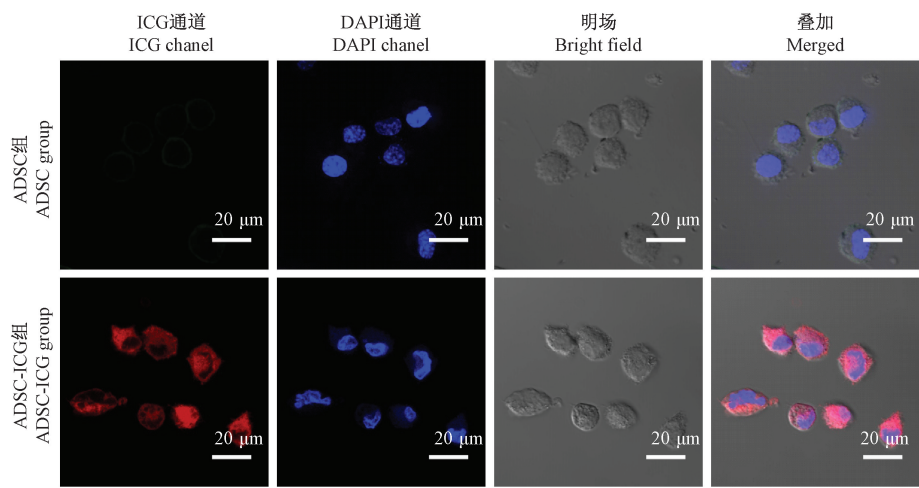


图 2 ADSC 经生物正交点击化学修饰 ICG 后的共聚焦图

Figure 2 Laser confocal microscopy images of ADSC labeled with ICG by bio-orthogonal click chemistry

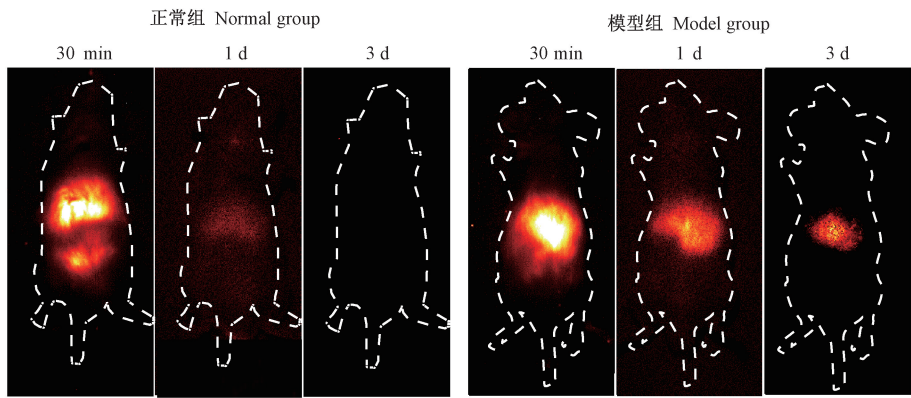


图 3 基于近红外二区荧光成像的 ADSC 活体示踪

Figure 3 *In vivo* ADSC tracking by near-infrared II fluorescence imaging

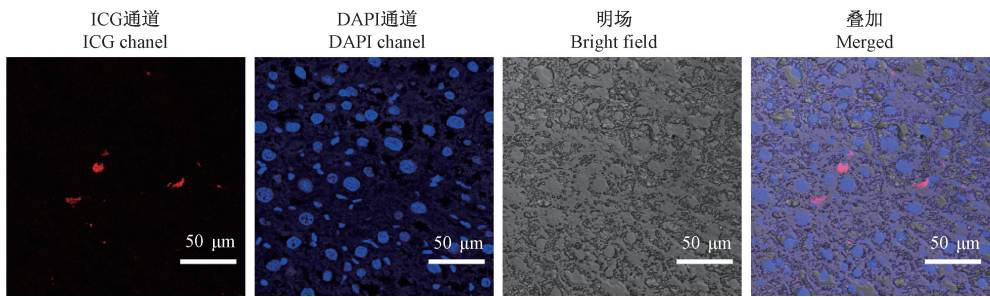


图 4 ADSC 移植 3 d 后在肝组织切片定位的共聚焦图

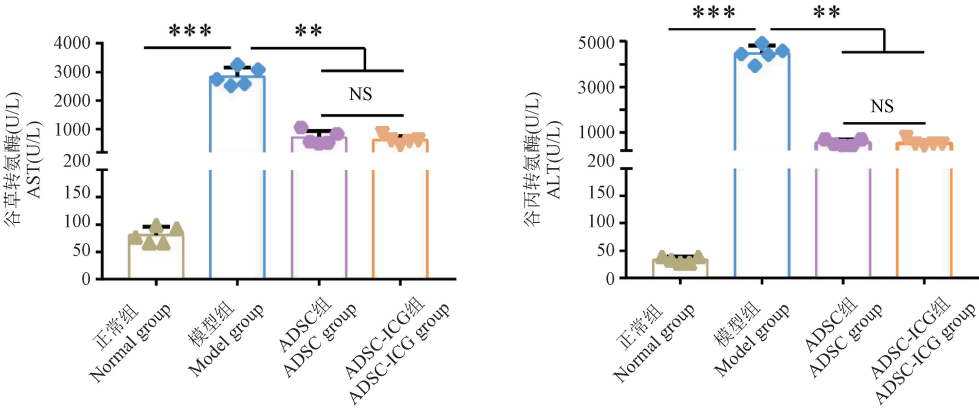
Figure 4 Laser confocal microscopy images of ADSC after transplantation for 3 days

ADSC 可改善急性肝损伤小鼠的肝功能;与 ADSC 组比较,经生物正交点击化学修饰不影响 ADSC 移植改善急性肝损伤肝功能的疗效,说明生物正交点击化学修饰具有良好的生物相容性。

2.6 生物正交点击化学修饰 ICG 对 ADSC 移植治疗急性肝损伤肝功能形态的影响

如图 6 所示,与正常组比较,模型组中多数肝细

胞坏死,肝门静脉周围有少许炎症细胞浸润,ADSC 组与 ADSC-ICG 组的肝细胞坏死区域明显减少,提示 ADSC 移植可以减少肝细胞坏死、改善小鼠肝组织病理形态;同时,ADSC 组与 ADSC-ICG 组的肝组织病理形态无明显差异,说明生物正交点击化学修饰不影响 ADSC 移植改善急性肝损伤肝显微形态的疗效。



注:两组间相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 1.001$ 。
图 5 ADSC 治疗急性肝损伤小鼠的血清 ALT、AST 含量
Note. Compared with each other, ** $P < 0.01$, *** $P < 1.001$.

Figure 5 Serum level of ALT and AST after ADSC transplantation for acute-liver injured mice

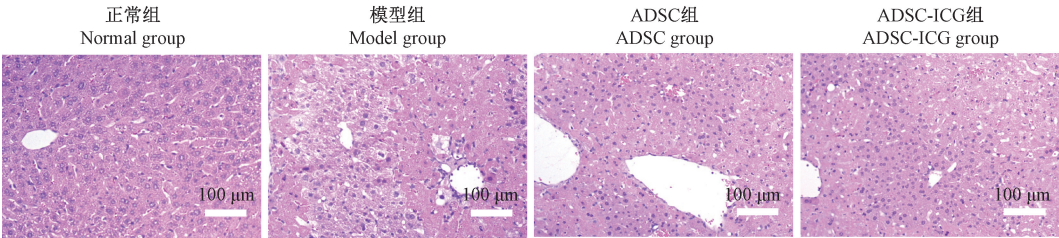


图 6 肝组织的病理学检查
Figure 6 Pathological examination of liver tissues

3 讨论

点击化学反应是由卡尔·巴里·沙普利斯于2001年提出来,它是一种发生在成对试剂之间的化学反应,该化学反应于2022年获得诺贝尔化学奖(获奖的教授包括卡罗琳·贝尔托齐、莫滕·梅尔达尔和卡尔·巴里·沙普利斯三位)^[17]。生物正交点击化学反应是利用细胞糖代谢工程、点击化学反应相结合的一种新型用于细胞靶向修饰、细胞标记的新技术^[18-19]。其中,叠氮-炔点击化学反应是细胞标记最常用的方法^[20-23]。其原理主要是细胞吞噬Ac4ManNAz等糖分子后,经糖代谢工程暴露叠基团,然后与携带炔基的靶向分子、探针通过点击化学反应,实现细胞的靶向修饰及探针标记。前期研究显示,利用生物正交点击化学反应将NK细胞表面修饰具有肝癌靶向的适配体,该方法不仅不影响NK细胞原有的功能,还可进一步提高NK细胞向肝癌组织的归巢效率,即提高了NK细胞治疗肝癌的移植效率,并最终增强其抗肿瘤的疗效^[24]。据此,生物正交点击化学反应可用于细胞标记及活体示

踪研究。
本实验结果表明,经生物正交点击化学反应修饰,ADSC可成功的标记ICG荧光探针,同时该方法不影响ADSC细胞活性,也不影响ADSC改善急性肝损伤肝功能、肝组织病理形态的疗效,这些结果均说明生物正交点击化学反应修饰可以用于ADSC细胞标记,且其生物安全性较好。另外,ADSC的靶向归巢性,在前期大量的研究中已被证实,本研究发现了ADSC可以靶向归巢至受损的肝组织内,进一步证实了ADSC的靶向归巢性。

参 考 文 献(References)

[1] Hoang DM, Pham PT, Bach TQ, et al. Stem cell-based therapy for human diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7 (1): 272.
[2] Maeng SW, Ko JY, Park TY, et al. Adipose stem cell transplantation using adhesive protein-based viscous immiscible liquid for cartilage reconstruction [J]. Chem Eng J, 2023, 463: 142379.
[3] Farooqui N, Mohan A, Isik B, et al. Effect of hypoxia preconditioning on the regenerative capacity of adipose tissue derived mesenchymal stem cells in a model of renal artery Stenosis

- [J]. Stem Cell, 2023, 41(1): 50–63.
- [4] Renesme L, Pierro M, Cobey KD, et al. Definition and characteristics of mesenchymal stromal cells in preclinical and clinical studies; a scoping review [J]. Stem Cell Transl Med, 2022, 11(1): 44–54.
- [5] Ye Y, Zhang X, Su D, et al. Therapeutic efficacy of human adipose mesenchymal stem cells in Crohn's colon fibrosis is improved by IFN- γ and kynurenic acid priming through indoleamine 2, 3-dioxygenase-1 signaling [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 465.
- [6] Liao N, Su L, Cao Y, et al. Tracking cell viability for adipose-derived mesenchymal stem cell-based therapy by quantitative fluorescence imaging in the second near-infrared window [J]. ACS Nano, 2022, 16(2): 2889–2900.
- [7] Wang F, Wang Q, Zhao Y, et al. Adipose-derived stem cells with miR-150-5p inhibition laden in hydroxyapatite/tricalcium phosphate ceramic powders promote osteogenesis via regulating Notch3 and activating FAK/ERK and RhoA [J]. Acta Biomater, 2023, 155: 644–653.
- [8] Ni JS, Li Y, Yue W, et al. Nanoparticle-based cell trackers for biomedical applications [J]. Theranostics, 2020, 10(4): 1923–1947.
- [9] Bulte JWM, Wang C, Shakeri-Zadeh A. *In vivo* cellular magnetic imaging: labeled *vs.* unlabeled cells [J]. Adv Funct Mater, 2022, 32(50): 2207626.
- [10] Shalaby N, Kelly JJ, Sehl OC, et al. Complementary early-phase magnetic particle imaging and late-phase positron emission tomography reporter imaging of mesenchymal stem cells *in vivo* [J]. Nanoscale, 2023, 15(7): 3408–3418.
- [11] Yoon HY, Koo H, Kim K, et al. Molecular imaging based on metabolic glycoengineering and bioorthogonal click chemistry [J]. Biomaterials, 2017, 132: 28–36.
- [12] Yoon HY, Lee D, Lim DK, et al. Copper-free click chemistry; applications in drug delivery, cell tracking, and tissue engineering [J]. Adv Mater, 2022, 34(10): e2107192.
- [13] Yoon JH, Choi JI, Jeong YY, et al. Pre-treatment estimation of future remnant liver function using gadoxetic acid MRI in patients with HCC [J]. J Hepatol, 2016, 65(6): 1155–1162.
- [14] Chen H, Wang Y, Xie Z, et al. Application effect of ICG fluorescence real-time imaging technology in laparoscopic hepatectomy [J]. Front Oncol, 2022, 12: 819960.
- [15] Liang Y, Zhang Z, Dai Z, et al. Comparative study of indocyanine green (ICG)-R15 and Albumin-Indocyanine Green Evaluation (ALICE) grading system in the prediction of posthepatectomy liver failure and postoperative mortality in patients with hepatic alveolar echinococcosis [J]. BMC Gastroenterol, 2022, 22(1): 297.
- [16] Møller S, Henriksen JH, Sjøstedt S, et al. Determination of hepatic clearance by derivations of the indocyanine green retention test in cirrhosis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2022, 37(4): 692–699.
- [17] Bauer D, Sarrett SM, Lewis JS, et al. Click chemistry: a transformative technology in nuclear medicine [J]. Nat Protoc, 2023, 18(6): 1659–1668.
- [18] Yoon HI, Yhee JY, Na JH, et al. Bioorthogonal copper free click chemistry for labeling and tracking of chondrocytes *in vivo* [J]. Bioconjug Chem, 2016, 27(4): 927–936.
- [19] Takayama Y, Kusamori K, Nishikawa M. Click chemistry as a tool for cell engineering and drug delivery [J]. Molecules, 2019, 24(1): 172.
- [20] Saxon E, Bertozzi CR. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction [J]. Science, 2000, 287(5460): 2007–2010.
- [21] Ricks TJ, Cassilly CD, Carr AJ, et al. Labeling of phosphatidylinositol lipid products in cells through metabolic engineering by using a clickable myo-inositol probe [J]. Chembiochem, 2019, 20(2): 172–180.
- [22] Agard NJ, Bertozzi CR. Chemical approaches to perturb, profile, and perceive glycans [J]. Acc Chem Res, 2009, 42(6): 788–797.
- [23] Kiick KL, Saxon E, Tirrell DA, et al. Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(1): 19–24.
- [24] Zhang D, Zheng Y, Lin Z, et al. Equipping natural killer cells with specific targeting and checkpoint blocking aptamers for enhanced adoptive immunotherapy in solid tumors [J]. Angew Chem Int Ed, 2020, 59(29): 12022–12028.

[收稿日期] 2023-05-06