

文章编号: 1001-6325(2015)04-0528-03

短篇综述

干细胞标记及示踪技术的应用研究

牛艳君¹, 李莹², 白仲添², 吕青芳³, 严祥^{1*}

(兰州大学第一医院 1. 老年病科; 2. 甘肃省生物治疗与再生医学重点实验室; 3. 肿瘤内科, 甘肃 兰州 740000)

摘要: 在基础研究及临床应用中, 对干细胞迁徙路径的标记及在靶病灶的作用研究已成为重点。采用创新性、突破性的干细胞标记及示踪技术, 了解干细胞在机体内的迁徙途径, 监测和追踪干细胞移植治疗后的效果, 对其在动物实验和临床应用方面都起到良好的促进作用。

关键词: 干细胞标记; 示踪; 迁徙途径

中图分类号: R-331 文献标志码: A

Application research on stem cell marker and cell tracing

NIU Yan-jun¹, LI Ying², BAI Zhong-tian², LÜ Qing-fang³, YAN Xiang^{1*}

(1. Dept. of Geriatrics; 2. Key Laboratory of Biotherapy and Regenerative Medicine;

3. Dept. of Oncology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 740000, China)

Abstract: In the basic and clinical researches, the tracing methods and its effects of stem cells is targets have been of the focusing issue. Hence, it's critical to create innovative and breakthrough methods for stem cell marker and cell tracing, to explore the migration routes and its reciprocity with microenvironment targets in the body, to monitor and track the outcome after stem cell transplantation therapy, it will play a good role in promoting animal experiment and clinical applications.

Key words: stem cells marker; cell tracing; migratory pathways

近年来,随着医学的发展,人们发现传统方法只能使许多器官损伤疾病减轻其并发症,不能从根本上解决疾病的根本问题,患者的健康水平和生活质量、精神状态都遭受严重的威胁。医学的进步需要研究新的临床治疗手段,干细胞应用于疾病的治疗研究,为临床事业带来良好的应用前景,并且得到了越来越多研究的证实,动物实验及临床试验已取得令人鼓舞的研究成果。但是,干细胞在疾病治疗用途中真正起作用的机制至今不明,干细胞的标记方

法及示踪技术没有明显的突破性是其原因之一,为了更好地了解干细胞在机体内的迁徙途径,本文对国内外干细胞的发展、标记及示踪技术进行了回顾和总结,为干细胞的基础研究及作用机制的揭示起一定的支撑作用。

1 干细胞的标记及示踪技术

1.1 基因转染标记法

在干细胞上标记转染基因,检测干细胞移植后

收稿日期: 2014-11-06 修回日期: 2014-12-29

基金项目: 甘肃省科技重大专项(2013GS08977); 甘肃省自然科学基金(1208RJZA219); 中央高校自由探索面上项目(lzujbky-2012-167)

* 通信作者(corresponding author): yanxiang528@suhu.com

的生物学特性。绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记干细胞在实验中尤为常见。GFP 不需要与其他物质合作,只需要用蓝光照射,就能自我发光。GFP 的荧光稳定,易于构建载体、可进行活细胞定时定位观察、在许多动植物中都能够表达成功并发出荧光,可用显微镜呈像技术方便地在活细胞中检测,适用与其他荧光试剂同时进行双标实验。GFP 对干细胞进行标记最明显的优势是无需底物或辅因子参与,即可在活细胞或动物中进行有效地标记,GFP 已成功地靶入了大部分细胞器中^[1]。目前,GFP 的具体半衰期还未知,不利于在实验中对时间的掌控,并且一些物理因素如高温等;化学因素有强酸等可以破坏它水化层或双电层,对其进行降解。

1.2 荧光染料标记法

干细胞移植前,使用荧光素进行预先标记,移植后利用荧光显微镜观察荧光标记的干细胞的迁徙情况,目前以 Dil 的衍生物 CM-Dil 的标记更为高效。CM-Dil 通过与膜结构的脂质分子结合而标记细胞,有着强而稳定的红色荧光,它容易嵌进生物膜内并在膜内做定向扩散运动从而标记整个细胞,是目前最好的荧光染料^[2]。CM-Dil 标记细胞后再进行各种操作都不会影响其荧光,是免疫荧光组化和原位杂交中理想的细胞荧光标记染料。CM-Dil 标记后荧光在胞内表达稳定,阳性标记率高,标记细胞形态良好,能有效地观察细胞在体外的诱导分化情况^[3]。但是,CM-Dil 是通过细胞膜进行标记,随着细胞的分裂增殖造成荧光的指数级衰减,使其很难维持长时间的高标记率。

1.3 荧光原位杂交标记法

荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 方法,即制备 DNA 或 RNA 探针,通过原位杂交的方法,使特定的 DNA 或 RNA 序列在细胞或染色体上显示出来,使用荧光显微镜检测,最后对其结果进行分析。FISH 技术^[4]使用经济、增强了安全性,简化操作流程、效率高和定位准确。多色 FISH 通过在一个核中显示不同的颜色可同时检测多种序列,既可以在载玻片上显示中期染色体数量或结构的变化,也可以在悬液中显示间期染色体 DNA 的结构。荧光原位杂交技术对及时发现肿瘤和预后都有良好的指导作用。但是,该方法不能达到 100% 杂交,特别是在应用较短的 cDNA 探针时

效率明显下降。

1.4 核酸标记法

5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 是一种嘧啶类似物,与内源性胸腺嘧啶核苷竞争插入 DNA 中,经过免疫组化染色,跟随标记细胞增殖传代,反映细胞增殖并且跟踪检测移植细胞动态变化^[5]。核素标记法避免了放射性污染,安全性高,并且 BrdU 抗体不与胸腺嘧啶发生交叉反应,对活体动物进行标记时,无任何不良反应。在研究干细胞体内移植后的分化时,更可采用双标法显示干细胞的其他特性。但是,BrdU 标记存在着标记率不稳定的特点,随着标记时间的增长,细胞的凋亡,吞噬细胞的吞噬作用,周围细胞也可能被 BrdU 标记,移植细胞标记强度降低或丢失,从而很难测定出真正需要检测观察的干细胞。

1.5 磁共振成像技术

磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 活体示踪 SPIO 细胞已经成为新的研究热点。在体外使用 SPIO 对干细胞进行标记,经过转染剂修饰后进一步提高细胞的有效磁标记率,含铁颗粒即可进入移植细胞内,标记率可达到 99%^[6]。在一定的浓度范围内,铁颗粒对细胞的活性没有明显的影响,然后利用磁共振成像对干细胞进行追踪,根据其位置的改变和信号的衰减从而判断干细胞的增殖、移行和空间分布情况,SPIO 纳米颗粒标记技术逐渐成熟^[7]。但是,实验过程中,细胞增生分裂死亡,氧化铁微粒会残留在死亡的组织内或者被巨噬细胞吞噬,会导致标记敏感性下降,造成假阳性结果,同时,需要考虑氧化铁造影剂颗粒对机体所产生的长期影响。

1.6 近红外荧光成像技术

半导体量子点 (Quantum Dots, QDs) 为现在广泛使用的近红外荧光材料,QDs 具有宽而连续的吸收谱,光漂白性小,可进行活体内示踪成像和长时间观察;同时,观察标记的干细胞不需要注入其他的试剂或酶等,相对要方便许多。采用深红色荧光 (DiR) 对移植入动物体内干细胞的情况进行评估,清楚地看到干细胞从动物的脾脏移行到肝脏^[8]。近红外荧光成像技术生物穿透能力强、光子量探测阈值低、检测灵敏度高,在干细胞示踪标记中展现出巨大的应用潜力。但是半导体量子点等无机染料对人类有一定不良反应,如何在降低量子点分辨率的前提下,降低不良反应是近红外荧光成像技术开

发研究的重点。

1.7 Y 染色体标记示踪

Y 染色体是属于 XY 性别决定系统雄性个体的特异性基因结构,稳定而持久存在,针对 Y 染色体上特异的基因序列进行标记,制备探针,可以对标记的干细胞进行长久的示踪,移植入雌性动物体内,利用性别的差异对干细胞进行识别,随后若检测雌性受体动物靶区域含有 Y 染色体,则证明该细胞为移植进来的外源性供体细胞,不需要对干细胞进行额外的实验处理,优势明显。但 Y 染色体的稳定性和灵敏度还需要进一步实验的研究和验证。

1.8 常染色体标记示踪

标记染色体是在肿瘤细胞内常见到结构异常的染色体,具有有特殊的形态,且便于识别。将干细胞某一性状定位于动物染色体的一特定区域,根据标记染色体的特异性去检测干细胞。这种方法尚未在干细胞移植的动物实验和临床研究中使用,还需要完善的理论和大量的实验进行证实。

1.9 循环细胞(CellSearch)标记示踪

CellSearch 系统^[9]是目前自动化程度最高的

CTCs 检测技术,受人为因素影响较小,该系统集免疫磁珠富集技术和免疫荧光技术于一体,具有较高的特异性和可重复性,能够实时反应肿瘤的生物状态,动态识别肿瘤分子靶点,为患者个体化治疗提供可靠的理论基础和临床证据^[10]。如果使用这项技术,能够对标记干细胞进行动态示踪,就能够实时检测干细胞,干细胞标记及示踪的研究将会出现新的领域。

2 干细胞标记及示踪技术的总结与展望

研究创新性、突破性的干细胞标记示踪技术,有助于进一步了解干细胞发挥功能的机制,从而使其转化为有效的临床应用治疗。理想的干细胞标记方法应具有简单易行、特异性强、灵敏度高、无明显毒性、受外界干扰因素小和假阳性率低等特点。当前,成熟的干细胞标记示踪技术方法众多,但每一种方法都有其优缺点,干细胞移植后,难以对移植后细胞的功效做客观准确的评价。目前,一些特异性和标志性的标记及示踪技术需要进一步深入研究,这将有助于了解干细胞在机体的迁徙途径、存活时间、相互作用以及改善组织微环境的影响因子。

参考文献:

- [1] Tang L, Chang J. Effect of GFP-containing lentivirus infection on the expression of octamer transcription factor 4 in human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Cell Mol Biol*, 2013, 29: 292-296.
- [2] Golab K, Kizilel S, Bal T, *et al.* Improved coating of pancreatic islets with regulatory T cells to create local immunosuppression by using the biotin-polyethylene glycol-succinimidyl valeric acid ester molecule [J]. *Transpl Proc*, 2014, 46: 1967-1971.
- [3] Li CZ, Xiao JM, Chen LX, *et al.* Isolation, culture and CM-Dil labeling of rat mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*, 2014, 18: 39-44.
- [4] Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, *et al.* Arm-specific telomere dynamics of each individual chromosome in induced pluripotent stem cells revealed by quantitative fluorescence in situ hybridization [J]. *Tissue Cell*, 2014, 46: 470-476.
- [5] Sauerzweig S, Baldauf K, Braun H, *et al.* Time-dependent segmentation of BrdU-signal leads to late detection problems in studies using BrdU as cell label or proliferation marker [J]. *J Neurosci Methods*, 2009, 177: 149-159.
- [6] Chickera S, Willert C, Mallet C, *et al.* Cellular MRI as a suitable, sensitive non-invasive modality for correlating *in vitro* migratory efficiencies of different dendritic cell populations with subsequent immunological outcomes [J]. *Int Immunol*, 2012, 24: 29-41.
- [7] Struys T, Ketkar-Atre A, Gervois P, *et al.* Magnetic resonance imaging of human dental pulp stem cells *in vitro* and *in vitro* [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22: 1813-1829.
- [8] Ezzat T, Dhar DK, Malago M, *et al.* Dynamic tracking of stem cells in an acute liver failure model [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18: 507-516.
- [9] Sastre J, Maestro ML, Gomez-Espana A, *et al.* Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a spanish cooperative group for the treatment of digestive tumors study [J]. *Oncologist*, 2012, 17: 947-955.
- [10] Broersen LH, van Pelt GW, Tollenaar RA, *et al.* Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2014, 37: 9-15.