

# Hoechst33342 标记大鼠骨髓间充质干细胞及其在大鼠体内的迁移

侯费祎<sup>1</sup> 谢兴文<sup>2</sup> 席芳琴<sup>3</sup> 李盛华<sup>2</sup> 宋敏<sup>1</sup>

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)07-0618-05

**摘要:** 目的 检测外源性的 BMSCs 是否可向骨缺损处迁移, Hoechst3342 标记 BMSCs, 从而跟踪外源性 BMSCs 在体内的迁移, 研究其归巢机制可行性。方法 贴壁筛选提取大鼠 BMSCs, 培养至第三代, 用 Hoechst33342 标记后, 尾静脉回植于颅骨缺损的大鼠体内, 14d 后处死大鼠, 取颅骨, 切片, 荧光显微镜下观察细胞迁移情况。主要观察指标: 光学显微镜下观察不同时期细胞形态和表面抗原检测; 荧光显微镜下观察 Hoechst33342 标记后细胞形态, 以及细胞增殖率; 组织切片上 Hoechst33342 标记的阳性细胞。结果 筛选纯化的 BMSCs 呈均一的成纤维细胞样, 贴壁生长, 以长梭形为主。CD45 阴性, CD44、CD90 均呈阳性表达; 组织切片上可见 Hoechst33342 标记大鼠的 BMSCs。结论 外源性的 BMSCs 可向骨缺损处迁移; Hoechst33342 可以标记 BMSCs, 从而跟踪外源性 BMSCs 在体内的迁移, 进而研究其归巢机制。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞; 细胞迁移; Hoechst33342

**Rat bone mesenchymal stem cells labeled with Hoechst33342 and their migration in vivo** XIE Xingwen<sup>1</sup>, HOU Feiwei<sup>2</sup>, LI Ning<sup>2</sup>, et al. 1. The Institute of Chinese Traditional Medicine in Gansu; 2. Gansu Chinese Traditional Medicine College, 730000, China; 3. Ningxia Autonomous Region People Hospital 750021, China

Corresponding author: XIE Xingwen, Email: xxw1972@hotmail.com

**Abstract: Objective** To detect the migration of exogenous bone mesenchymal stem cells (BMSCs) in the bone defective site and to research the feasibility of homing mechanism through tracing the migration of exogenous BMSCs labeled with Hoechst 33342 in vivo. **Methods** Rat BMSCs were extracted and screened using the adherence method. After cultured to the third generation, BMSCs were labeled with Hoechst 33342 and then replanted in the rats with skull defect through tail vein. Rats were killed after 14 days and the skull were sliced to observe the cell migration under fluorescence microscopy. The main observed indexes included cell morphology and surface antigen detection of different periods using light microscopy, morphology of cells labeled with Hoechst 33342 and cell proliferation under fluorescence microscopy, and the positive cells labeled by Hoechst 33342 in tissue sections. **Results** Purified BMSCs showed homogeneous fibroblast-like morphology, mainly with long fusiform and adherent growth. CD45 was negative in these cells. However, CD44 and CD90 were positive. BMSCs labeled by Hoechst 33342 were observed in the sections. **Conclusion**

Exogenous BMSCs can migrate to the bone defect site *in vivo*. Migration of exogenous BMSCs can be traced using Hoechst 33342 to research the homing mechanism.

**Key words:** BMSCs; Cell migration; Hoechst 33342

基金项目: 国家自然科学基金项目, 编号: 81060299

作者单位: 1. 730000 甘肃中医学院(侯费祎、李宁、宋敏);  
2. 730050 甘肃省中医药研究院(谢兴文、李盛华); 3. 750021 宁夏回族自治区人民医院

通讯作者: 谢兴文, 硕士生导师, Email: xxw19726@hotmail.com

万方数据

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一类来源于中胚层的未分化间充质干细胞, 在体内外均具有多向分化潜能和较强的增殖能力<sup>[1-2]</sup>, 进行异体移植也不会出现排斥反应<sup>[3]</sup>, 是组织工程的首选种子细胞, 有着非常重要的理论研究和临床应用价值<sup>[4-7]</sup>, 是移植领域应

用前景广阔的再生来源细胞<sup>[8]</sup>, 所以对于外源性 BMSCs 在体内迁移、跟踪的研究有很重大的意义。随着对 BMSCs 研究治疗骨科疾病的不断成熟, 对于如何对外源性 BMSCs 体内迁移, 归巢的跟踪, 从而了解其机制, 促进骨折愈合, 是目前研究的重点。而 Hoechst33342 用于标记大鼠 BMSCs, 跟踪其在大鼠在体内是否有向骨缺损迁移的研究, 目前还未见相关报道。本实验利用 Hoechst33342 标记大鼠 BMSCs 后, 然后回植于颅骨骨缺损的大鼠体内。观察 Hoechst33342 对大鼠 BMSCs 在体内外标记情况, 以及外源性 BMSCs 在体内是否可以向骨缺损处迁移。

## 1 材料

氯胺酮(西安力邦制药有限公司), 四季青胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司), 细胞培养基: D-MEM/F-12 (GIBCO 公司), 胰蛋白酶 (SIGMA 公司), 乙二胺四乙酸 (EDTA) (分析纯 莱阳市双双化工厂), Hoechst33342 (博奥森公司), 倒置相差显微镜 (CX-17), 二氧化碳培养箱 (MCO-15AC), 高压灭菌器 (LDZX-30KBS), SPF 级 SD 大鼠 20 只 (4 月龄, 雌雄各半, 体重 200 ~ 220 g, 由甘肃中医学院动物实验中心提供)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

采用贴壁筛选法进行 BMSCs 的分离, 培养。在无菌条件下取出 SPF 级 SD 大鼠股骨和胫骨, 去除周围组织, 剪除干骺段, 暴露髓腔。用培养液对髓腔进行冲洗, 过滤, 吹打均匀后移入培养皿内, 在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱内培养, 每 3 天换液一次。在相差显微镜见细胞汇合成单层, 即可用胰蛋白酶消化法以 1:2 的比例进行传代培养。传至第三代, 对培养后的细胞在相差倒置显微镜下进行细胞形态学观察。

### 2.2 细胞表型鉴定 (CD45、CD44、CD90)

原代细胞传代至 P3 代后, 0.25% 胰酶消化细胞至细胞颜色变白, 形态皱缩后, 培养基终止, 反复吹打后, 将细胞悬液置于离心管中, 1000 r/min, 离心 10 min, 弃去上清。2、加 10 ml PBS, 1000 r/min 离心 10 min, 弃去上清。重复 3 次。3、然后取 1 ml PBS + 200 μL 细胞 + 1 抗 50 μL (1 抗用 PBS 稀释, 稀释为比例 1:40) 37℃, 避光, 孵育。4、30 min 后, 加 10 ml PBS, 1000 r/min 离心 10 min, 弃去上清。重复 3

次。5、然后加 500 μL PBS 后检测。

### 2.3 成脂诱导

细胞传至第三代时, 利用成脂诱导液 (0.5 mM 3-异丁基-1-甲基 (IBMX), 10 μM 胰岛素, 0.5 μM 地塞米松, 高糖 DMEM, 10% 胎牛血清) 进行诱导, 15 天后利用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 蒸馏水漂洗 3 次, 油红 O 染色, 拍片记录。

2.4 成骨诱导细胞传至第三代时, 利用成骨诱导液 (10 mmol/L 的 β-甘油磷酸钠、1 × 10<sup>-7</sup> mol/L 地塞米松、50 μg/ml 抗坏血酸) 进行诱导, 25 天后利用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 蒸馏水漂洗 3 次。5% 硫代硫酸钠孵育 30 min, 蒸馏水冲洗, 加入 1% 硝酸银溶液, 紫外灯下染色 30 min, 蒸馏水冲洗掉浮于表面的黑色物质, 继续用 5% 硫代硫酸钠染色 20 min, 蒸馏水漂洗后观察, 拍片照相记录 (Von kossa 染色)。

### 2.5 细胞标记、增殖率检测

P3 代细胞在避光情况下加入 hoechst33342 浓度为 5 μg/mL (无血清培养基稀释)。37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养 1 h 后, 弃掉含有 hoechst33342 的培养基, 用胰酶消化, 按 3 × 10<sup>4</sup> 个/mL 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL, 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下分别培养 24 h、48 h、72 h 后, 弃培养液, PBS 漂洗 2 次, 换含 0.5% MTT 的无血清的 DMEM/F12 培养液, 继续孵育 4 h, 弃培养液, 每孔加入 100 μL 的 DMSO, 摇床振荡 10 min, 测 490 nm 处吸光度值。

### 2.6 细胞回植

将标记好的大鼠 BMSCs 用胰酶进行消化, 配置成 1 × 10<sup>9</sup> cells/L 细胞混悬液, 通过尾静脉注入造模大鼠体内, 每只造模大鼠注射 1 ml。

### 2.7 大鼠颅骨骨缺损模型的建立

行腹腔麻醉 (用氯胺酮 (0.1 g · kg<sup>-1</sup>) 后, 麻醉后, 取侧卧位, 术野处剪毛消毒, 手术部位脱毛消毒。在头部右侧做一纵行切口, 暴露颅骨并切除局部骨膜。用环钻造成直径 6mm 的圆形骨缺损。生理盐水冲洗骨缺损部位以去除残存骨屑, 逐层缝合伤口, 造模第二天, 尾静脉注入 Hoechst33342 标记过的大鼠 BMSCs。

### 2.8 饲养及标本制备

造模后在甘肃中医学院 SPF 级动物实验中心动物房饲养, SPF 级动物专用饲料饲养, 饮食、饮水无限制。2 周后处死动物, 取骨缺损处骨痂后置于预先配好的固定液 (4% 多聚甲醛) 中固定, 使组织细胞的蛋白质变性, 组织块硬化, 以保存组织细胞原

有的形态。16 h后自固定液取出组织块,须经流水洗涤,直至洗净为止。然后脱钙,12 d后骨组织变软。脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 显微镜下观察不同时期细胞生长情况

原代培养 24 h 后:各组细胞贴壁,未见明显差异,部分大圆形细胞开始贴壁生长,少量细胞呈现短梭形改变;原代培养 3 d 后,贴壁细胞明显增多,形态上以圆形和短梭形为主;细胞传至第 3 代时细胞增殖迅速,几乎全部贴壁生长,以长梭形为主,体积小,核浆比大(图 1)。

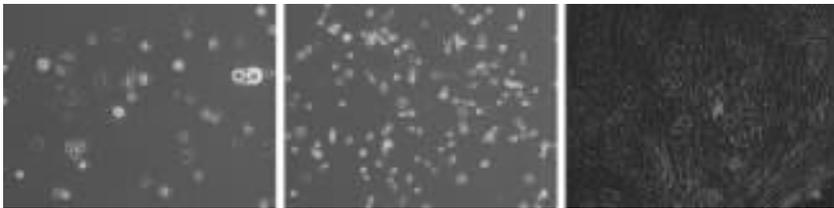


图 1 左至右分别为元代细胞培养 24 h 后、3 d 后的 P3 代细胞 200 ×

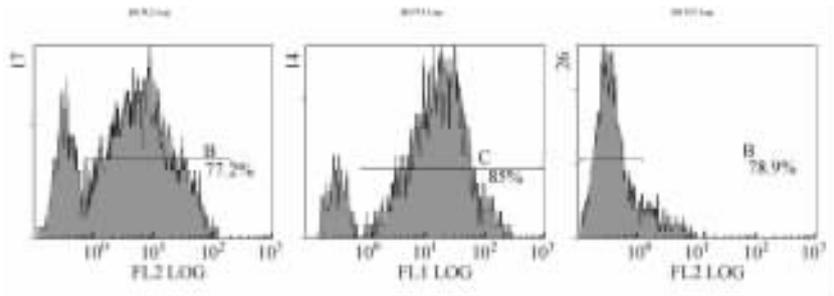


图 2 CD90 阳性率为 77.2% CD44 阳性率为 85% CD45 阴性率为 78.9

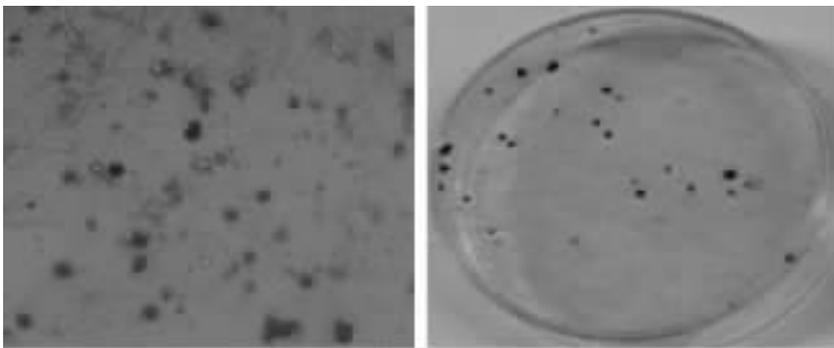


图 3 成脂诱导后 15 d 后,油红 O 染色成骨诱导 25 d 后,Von kossa 染色



万方数据 图 4 左至右分别为 Hoechst 标记 1 h (200 ×)、7d (200 ×)、25d (100 ×) 后细胞形态

### 2.2 细胞表型鉴定

CD45 阴性,CD34 和 CD90 均呈阳性表达(图 2)。

### 2.3 成脂诱导及成骨诱导

成脂诱导 15 天后,镜下可见脂肪颗粒,油红 O 染色为红色;成骨诱导 28 天后,细胞出现聚集,钙化现象,利用 Von kossa 染色,为黑色(图 3)。

### 2.4 细胞标记

Hoechst33342 标记细胞 1 h、7 d、25 d 后荧光显微镜下可见标记的淡蓝色椭圆形细胞核,连续激发 30 d 未见荧光猝灭(图 4)。

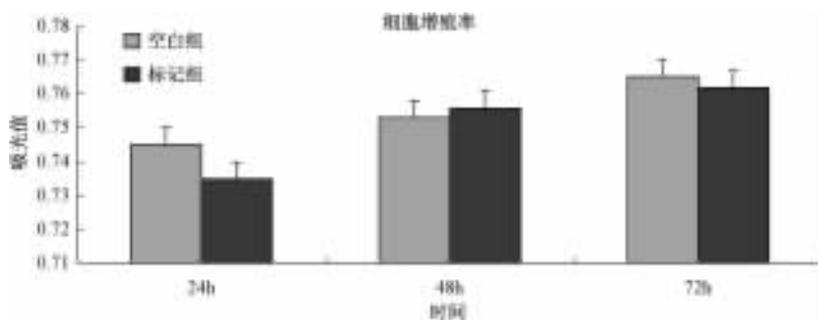


图5 细胞增殖率的测定

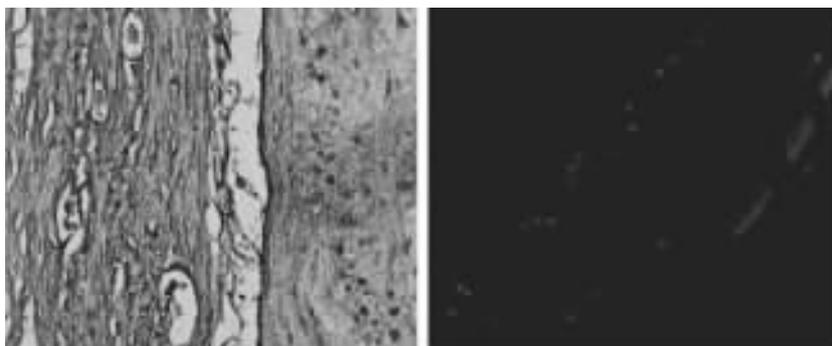


图6 光学显微镜下骨缺损切片 200× 荧光显微镜下阳性细胞 200×

## 2.5 标记后细胞增殖率检测

空白组和标记组比较,  $P > 0.05$ , 无统计学差异(图5)。

低倍荧光显微镜下可见切片标本中Hoechst33342标记的阳性细胞(图6)。

## 3 结论

骨髓间充质干细胞表型鉴定: CD45 阴性, CD44 和 CD95 均呈阳性表达; 外源性的 BMSCs 可向骨缺损处迁移; Hoechst3342 可以标记 BMSCs, 从而跟踪外源性 BMSCs 在体内的迁移, 进而研究其迁移归巢机制方法可行。

## 4 讨论

骨髓间充质干细胞是一种多向潜能干细胞<sup>[9-12]</sup>, 促进其在体内的迁移, 从而加快损伤部位的组织修复, 缩短愈合时间, 有很大的应用价值和研究意义。但是体内干细胞的数量较少, 很难满足修复损伤的需求, 这就依赖于体外植入外源性干细胞。而细胞标记是研究外源性干细胞体内迁移、归巢机制重要方法。

目前, 对于干细胞标记以及干细胞治疗的研究, 取得了一系列的优秀成果。姜晓锐等<sup>[13]</sup>研究发现

QD655 对大鼠 BMSCs 标记时间长, 标记率及安全性高, 是一种良好标记物。蒋泽生等<sup>[14]</sup>研究发现 CFSE 标记的小鼠脾细胞活力良好, 荧光显微镜下见全部细胞标记后均发绿色荧光, 形态正常, CFSE 标记阳性率为 95%。CFSE 染色时, 在浓度相差 20 倍时流式直方图才显示为两个完全独立的峰, 即 CFSE 低浓度用  $0.3 \mu\text{mol/L}$ , 高浓度用  $6 \mu\text{mol/L}$ 。异基因的 C57BL/6J 脾细胞在输注 1d 后就快速消失, 而同基因 BALB/c 脾细胞能够在 BALB/c 小鼠外周血中长期存在, 但是两种细胞荧光强度均未见降低, 说明荧光染料 CFSE 差异浓度标记活细胞进行体内示踪是一种稳定的示踪方法。詹兴旺等<sup>[15]</sup>研究发现 SPIO 可以安全有效地标记 BMSCs。孙合圣等<sup>[16]</sup>研究发现 MSC 移植可显著减轻内毒素诱导的急性肺损伤, 且这种作用强度是剂量相关的。卞琴等<sup>[17]</sup>研究补肾中药可能从增加 BMSCs 细胞外基质、促进生长因子相关信号通路、增加蛋白质合成等方面发挥促进 BMSCs 成骨分化的作用, 最终实现治疗骨质疏松的疗。虽然目前我们取得了许多的优秀成果, 对于干细胞标记以及疾病的治疗取得了长足的进展, 但目前也存在许多问题, 对于干细胞的体内迁移的具体机制尚不明确, 细胞标记的方法较多, 但其用于临床研究, 其有效性、可行性有待于进一步的

证实。

本实验研究结果发现,外源性骨髓间充质干细胞在体内可以向骨缺损处迁移;用Hoechst33342标记骨髓间充质干细胞,跟踪研究其迁移、归巢机制方法是可行的。为研究外源性骨髓间充质干细胞在体内的迁移、归巢机制提供了很好的研究平台,从而进一步促进骨髓间充质干细胞治疗骨科相关疾病的研究。但也存在诸多问题,对于Hoechst33342标记的骨髓间充质干细胞在体内迁移过程中出现的细胞凋亡、裂解后,是否会造成细胞转染;其在体内对机体的各种细胞因子的表达、释放是否有影响;其荧光在激发的情况下,最长能持续多少时间;随着细胞的分裂、增殖,细胞体内的荧光染料逐渐减少,是否会影响细胞后期标记等问题,还有待于进一步的研究和证实。总之,对于干细胞标记,具有重要的研究意义,是研究干细胞迁移归巢机制的重要手段,对于干细胞标记的方法,还有待于进一步的研究。

#### 【 参 考 文 献 】

- [ 1 ] Clavin NW, Fernandez J, Schonmeyer BH, et al. Fractionated doses of ionizing radiation confer protection to mesenchymal stem cell pluripotency. *Plast Reconstr Surg*, 2008, 122(3):739-748.
- [ 2 ] 胡杨, 马莹, 何惠宇, 等. 骨髓间充质干细胞成骨方向诱导过程中的基因表达. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(49):9133-9136.
- [ 3 ] Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Eng*, 2007, 13(1):111.
- [ 4 ] Lu Yan, Zhang Yuan, Chi Zuo-hua. Differentiation of human bonemarrow-derived stem cells into insulin-producing cells in vitro and in vivo. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2009, 25(4):774-780.
- [ 5 ] Wang Ye, Deng Yu-bin, Li Yan, et al. Migration of enhanced green fluorescent protein labeled bonemarrow after transplantation into rat cerebral infarct. *Zhongguo Bingli Shengli Zazhi*, 2009, 25(3):519-524.
- [ 6 ] Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, et al. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci*, 2006, 26(13):3377-3389.
- [ 7 ] Thirion C, Lochmüller H, Ruzsics Z, et al. Adenovirus vectors based on human adenovirus type 19a have high potential for human muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(2):193-205.
- [ 8 ] 米坤龙, 卫小春. 骨髓间充质干细胞修复关节软骨缺损研究进展. *实用骨科杂志*, 2008, 14(1):35-37.
- [ 9 ] 李檀, 金星光, 王珏, 等. 骨髓源干细胞移植与中药蝮龙抗栓丸联合治疗对缺血再灌注大鼠脑内 NGF 的影响. *中国中医急症*, 2011, 20(1):80-82.
- [ 10 ] 邵文琳, 张丹丹, 王殿华. 小鼠骨髓间充质干细胞体外扩增的实验研究. *昆明医学院学报*, 2011(1):16-20.
- [ 11 ] 包敏, 张德平. 胰岛素样生长因子 1 作用下的骨髓间充质干细胞对大鼠肺纤维化的治疗作用及其机制. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2011, 10(1):42-49.
- [ 12 ] 杨锋, 唐德志, 卞琴, 等. 中药诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(10):1847-1849.
- [ 13 ] 姜晓锐, 张鑫鑫, 杨科跃, 等. 荧光微球体外标记大鼠 BMSCs 的初步研究. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 2010, 24(6):744-748.
- [ 14 ] 蒋泽生, 高毅. 荧光染料 CFSE 差异浓度标记活细胞体内示踪方法. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(15):2773-2777.
- [ 15 ] 詹兴旺, 姜艳, 王文良. SPIO 标记骨髓间充质干细胞和软骨细胞共培养的研究. *中国矫形外科杂志*, 2011, 19(9):770-773.
- [ 16 ] 孙合圣, 孙中厚, 班洪芳. 不同剂量骨髓间充质干细胞对大鼠急性肺损伤的影响. *辽宁医学院学报*, 2011, 32(2):110-112.
- [ 17 ] 卞琴, 刘书芬, 黄建华, 等. 3 种补肾中药有效成分对去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞的调控作用. *中华中医药杂志*, 2011, 26(5):889-893.

(收稿日期:2012-01-27)

# Hoechst33342标记大鼠骨髓间充质干细胞及其在大鼠体内的 迁移

作者: [侯费伟](#), [谢兴文](#), [席芳琴](#), [李盛华](#), [宋敏](#)  
作者单位: [侯费伟, 宋敏\(甘肃中医学院, 730000\)](#), [谢兴文, 李盛华\(甘肃省中医药研究院, 730050\)](#), [席芳琴\(宁夏回族自治区人民医院, 750021\)](#)  
刊名: [中国骨质疏松杂志](#)   
英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)  
年, 卷(期): 2012, 18(7)

## 参考文献(17条)

1. [Clavin NW;Fernandez J;Schonmeyr BH Fractionated doses of ionizing radiation confer protection to mesenchymal stem cell pluripotency](#) 2008(03)
2. [胡杨;马莹;何惠宇 骨髓间充质干细胞成骨方向诱导过程中的基因表达](#) 2010(49)
3. [Niemeyer P;Kornacker M;Mehlhorn A Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro](#) 2007(01)
4. [Lu Yan;Zhang Yuan;Chi Zuo-hua Differentiation of human bonemarrow-derived stem cells into insulin-producing cells in vitro and in vivo](#) 2009(04)
5. [Wang Ye;Deng Yu-bin;Li Yan Migration of enhanced green fluorescent protein labeled bonemarrow after transplantation into rat cerebral infarct](#) 2009(03)
6. [Karimi-Abdolrezaee S;Eftekharpour E;Wang J Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury](#) 2006(13)
7. [Thirion C;Lochmüller H;Ruzsics Z Adenovirus vectors based on human adenovirus type 19a have high potential for human muscle-directed gene therapy](#) 2006(02)
8. [米坤龙;卫小春 骨髓间充质干细胞修复关节软骨缺损研究进展](#) 2008(01)
9. [李檀;金星光;王珏 骨髓源干细胞移植与中药蝮龙抗栓丸联合治疗对缺血再灌注大鼠脑内NGF的影响](#) 2011(01)
10. [邵文琳;张丹丹;王殿华 小鼠骨髓间充质干细胞体外扩增的实验研究](#) 2011(01)
11. [包敏;张德平 胰岛素样生长因子1作用下的骨髓间充质干细胞对大鼠肺纤维化的治疗作用及其机制](#) 2011(01)
12. [杨锋;唐德志;卞琴 中药诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化](#) 2011(10)
13. [姜晓锐;张鑫鑫;杨科跃 荧光微球体外标记大鼠BMSCs的初步研究](#) 2010(06)
14. [蒋泽生;高毅 荧光染料CFSE差异浓度标记活细胞体内示踪方法](#) 2010(15)
15. [詹兴旺;姜艳;王文良 SPI0标记骨髓间充质干细胞和软骨细胞共培养的研究](#) 2011(09)
16. [孙合圣;孙中厚;班洪芳 不同剂量骨髓间充质干细胞对大鼠急性肺损伤的影响](#) 2011(02)
17. [卞琴;刘书芬;黄建华 3种补肾中药有效成分对去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞的调控作用](#) 2011(05)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zggzsszz201207008.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201207008.aspx)