

DiI 荧光标记的软骨细胞与支架材料复合后的观察

纪玲¹, 武延格², 孙学峰², 王正², 杨林²

(暨南大学附属第二医院 深圳市人民医院 1. 检验科; 2. 胸外科, 广东 深圳 518020)

[摘要] 目的:通过 DiI 荧光染料标记观察软骨细胞在聚乳酸/乙醇酸共聚物支架 (PLGA) 体外和体内培养环境中的生长状态,为研究组织工程化软骨探索一种理想的软骨细胞示踪方法。方法:体外分离培养大鼠剑突软骨细胞,应用 DiI 标记软骨细胞,通过 MTT 法测定细胞的增殖活性。DiI 荧光标记的软骨细胞种植于 PLGA 支架上分两组:一组体外培养 1 周,另一组体外培养 1 周后,再植入同系大鼠网膜体内培养 1 周。分别取出细胞-支架复合物,在荧光显微镜下观察体外和体内条件下软骨细胞的荧光表达情况。结果:应用 DiI 标记不影响软骨细胞的增殖,MTT 测定结果显示标记组和对照组的 A 值未见显著性差异 ($P > 0.05$)。标记后的软骨细胞显示环状红色荧光,胞核未着色。体外培养和体内培养的软骨细胞-支架复合物,均可在荧光显微镜下观察到红色荧光表达。结论:DiI 荧光染料能够有效标记软骨细胞,标记的细胞-支架复合物可直接在荧光显微镜下进行观察,可作为体外和体内构建组织工程软骨的较好的示踪方法。

[关键词] 组织工程; 软骨细胞; DiI 荧光标记

[中图分类号] R318.1; Q813 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)06-0640-04

Observation of the DiI labeled chondrocytes combined with scaffold by fluorescent microscope

Ji Ling¹, Wu Yan-ge², Sun Xue-feng², Wang Zheng², Yang Lin²

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Thoracic Surgery, Shenzhen People's Hospital, the 2nd Affiliated Hospital of Jinan University, Shenzhen 518020, China)

[Abstract] **Aim:** To find out a ideal cell labeling method for the study of tissue engineering cartilage, through observing the growth state of chondrocytes labeled by DiI and seeded on DegraPol scaffold *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Chondrocytes isolated from rat xyphoid was labeled by DiI, MTT test was used to determine the proliferation status of chondrocytes. Chondrocytes labeled by DiI were seeded onto PLGA scaffold, cultivated *in vitro* 1 week and cultivated *in vivo* 1 week after 1 week *in vitro* culture, respectively. The growth state of the DiI labeled cells by fluorescent microscope. **Results:** The fluoresce dye DiI showed no effect on the living status of chondrocytes. MTT test showed there was no significant difference between the proliferation of DiI labeled and unmarked chondrocytes. The chondrocytes labeled by DiI were observed clearly by fluorescent microscope. **Conclusion:** The chondrocytes labeled by DiI are well compatible with PLGA scaffold and observed continuously by fluorescent microscope. DiI label can be used as a good tracing method to observe tissue engineering cartilage.

[Key words] tissue engineering; chondrocyte; DiI fluorescent labeling

[收稿日期] 2009-03-03

[基金项目] 国家自然科学基金(30500499)

[作者简介] 纪玲(1970-),女,副教授,研究方向:移植免疫

通讯作者:杨林,副主任医师, E-mail: yanglin70@yahoo.com

组织工程技术是将种子细胞与三维支架材料复合,细胞在支架上黏附生长,形成新的具有生命力的组织或器官^[1]。由于支架材料本身不透光,在显微镜下很难直接观察到细胞的增殖情况,尤其是网孔状支架体内种植后混合软骨细胞和成纤维细胞生长,在光学显微镜下无法鉴别。DiI 即 DiI C18(3), 全称为 1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate,是最常用的细胞膜荧光探针之一,呈现橙红色荧光。DiI 是一种亲脂性膜染料,进入细胞膜后可以侧向扩散逐渐使整个细胞的细胞膜被染色。在 594nm 激发光下可以产生发射波长为 565 nm 红色荧光^[2]。1986 年 Honig 等^[3]首次报道 DiI 可作为荧光示踪剂用于培养的神经细胞和骨骼肌细胞。近年来 DiI 用来标记肝细胞、骨髓基质干细胞、脂肪干细胞等的示踪研究^[4-9],目前尚未见 DiI 标记软骨细胞观察细胞在聚乳酸/乙醇酸共聚物 (PLGA) 支架材料上生长状态的实验报道。本研究应用 DiI 标记软骨细胞,比较标记前后软骨细胞的增殖活性,并观察体外和体内培养环境中软骨细胞在支架材料上的标记情况。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料和设备

选用体质量 50~60 g 的 SPF 级 SD 大鼠,由广东省医学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(粤)2003-0002。PLGA 材料购自山东岱堡生物技术公司。将 PLGA 材料制成薄片状的三维多孔泡沫支架,长 20 mm,宽 5 mm,厚 1 mm,孔径为 150~200 μm ,孔隙率 >85%,环氧乙烷消毒后,置于已灭菌的培养瓶中备用。达尔伯克改良伊格尔培养液 (DMEM)、胎牛血清、II 型胶原酶、噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) 为德国 PAN Biotech 公司产品;Costar 3376 型 75 cm^2 细胞培养瓶、细胞培养板为美国 Corning 公司产品;倒置显微镜、荧光显微镜为日本 Olympus 公司产品;MR5000 自动酶标仪为美国 Dynatech 公司产品。

1.2 方法

(1) 软骨细胞的分离、传代 取 SD 幼鼠的剑突软骨,取出后立即在无菌超净台上去除软骨膜,放入含体积分数为 0.2% II 型胶原酶的无血清 DMEM 培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 8 h。离心后收集细胞,种植入含体积分数为 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养液中,在细胞培养瓶中进行传代培养,倒置显微镜下观察软骨细胞生长和增殖情况,本实验选用第 3 代软骨细胞。

(2) DiI 标记软骨细胞 将 DiI 用 DMSO 配成 2

g/L 溶液,以 10 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度标记细胞,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% 的 CO_2 、饱和湿度的细胞培养箱中恒温静置孵育 30 min, PBS 洗两遍后,胰酶消化 5 min,制备细胞悬液。荧光显微镜下 200 倍镜下随机选取 5 个视野,用下列公式计算标记率:标记率 = 暗视野所见红色荧光的细胞总数/明视野所见细胞总数。

(3) 标记后软骨细胞的增殖活性 用 MTT 法绘制生长曲线,将浓度为 2.5×10^4 的 DiI 标记前、后细胞悬液接种于 96 孔板,每孔 200 μL ,设 5 个复孔。分别于第 1、3、5、7 天取出 5 孔,每孔加入 5 g/L 的 MTT 液 20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 、饱和湿度下培养 4 h 后取出,小心吸弃孔内培养上清,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测出吸光度 A 值。

(4) 软骨细胞与 PLGA 支架的复合 收集标记过的软骨细胞为 $2.4 \times 10^{10}/\text{L}$ 软骨单细胞悬液均匀种植于 PLGA 支架,再向 6 孔培养板中每孔加入 10 mL DMEM 培养液,将含软骨细胞-PLGA 支架复合物的培养板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中,一组体外培养 1 周,另一组体外培养 1 周后,包埋于同系大鼠腹腔大网膜包裹培养 1 周。以未标记的软骨细胞种植于支架材料作为对照组。分别于体外/体内培养 1 周后取出标本,在荧光显微镜下观察支架材料上的细胞标记状况。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件包进行分析。数据以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 标记后的软骨细胞观察

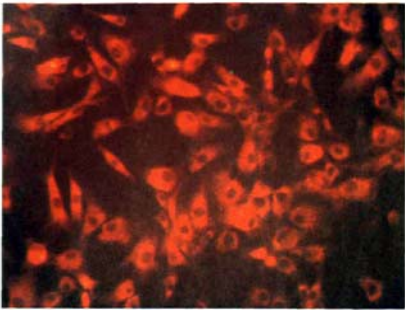
DiI 标记后,荧光显微镜下观察,染色后的所有细胞都被标记呈红色环状荧光,胞核未染荧光,标记阳性率达 100%。贴壁标记的软骨细胞仍呈保持了良好的形态(见图 1)。

2.2 标记后软骨细胞的增殖活性

MTT 法测定结果显示,标记的细胞生长,增殖状态良好,吸光度与未标记的细胞相比,无显著性差异 ($P > 0.05$),表明 DiI 染料无细胞毒性,不影响软骨细胞的增殖。

2.3 PLGA 材料上软骨细胞的标记情况

标记软骨细胞在 PLGA 支架上体外培养 1 周后,荧光显微镜下可见细胞黏附于支架材料表面,细胞膜发出红色荧光(图 3A)。软骨细胞-PLGA 复合物体内培养 1 周的荧光显微镜下观察仍然可以看到



软骨细胞呈现环状红色荧光 (×200)
图 1 DiI 标记的软骨细胞

大量的红色荧光的细胞生长,表明种植于支架材料上的软骨细胞仍然存活(图 3B)。

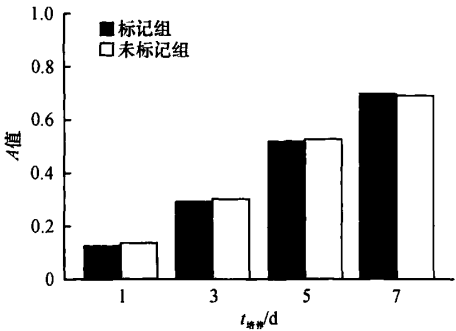
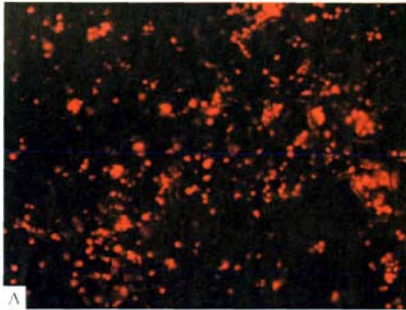
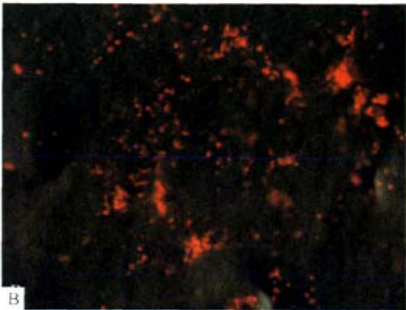


图 2 标记组和未标记组细胞生长曲线



软骨细胞-支架复合物体外培养 1 周 (×100)



软骨细胞-支架复合物体内培养 1 周 (×100)

图 3 支架材料上软骨细胞荧光显微镜下改变

3 讨论

种子细胞在支架材料上的生长状态是构建工程化组织的关键环节。组织工程支架材料是三维立体结构,透光性较差,光镜下仅能观察到透光空隙中的细胞分布。因此,需要一种能实时简便的方法来观察种植于支架材料上细胞的状态。常用的细胞标记方法都存在一定的缺陷。BrdU 标记检测时需经免疫组织化学反应而示踪,同时 BrdU 存在标记率不高的缺点,Sakai 在自体心脏细胞移植治疗心梗的研究中,用 BrdU 标记自体心房细胞 48 h 后移植,所得标记率仅为(61±6)%^[10]。绿色荧光蛋白(GFP)转染可以对活细胞中的蛋白质进行准确定位及动态观察,实时原位跟踪细胞生长,避免了其他方法带来的非特异性染色。GFP 转染存在着高效、稳定表达的 GFP 克隆较为困难而且高水平的 GFP 表达对细胞仍有一定的毒性等缺点。

DiI 是亲脂性荧光染料,其可以通过嵌入生物膜内作侧向扩散运动或者通过活体细胞的胞饮作用

而进入胞浆,从而标记整个细胞浆^[11]。在进入细胞膜之前荧光非常弱,当进入到细胞膜后可以被激发发出很强的荧光,并且不影响细胞的生长、增殖状态^[12-14]。DiI 对活体细胞无毒性,不从已标记的细胞转移到未标记的细胞,且荧光衰减慢。DiI 最初被用于荧光显微镜下观察细胞结合或内吞脂蛋白,同时也能进行半定量分析。DiI 标记优点在于它的示踪可以通过荧光显微镜直接观察解决了其他方法需要连续切片进行检测才能实现正确定位的缺点,而且可以进行连续动态观察。

本实验证实 DiI 能够在软骨细胞内稳定表达,标记阳性率高,不影响细胞的增殖活性,而且操作简单,经过体外和体内培养均可看到红色荧光标记的细胞生长,能反映出软骨细胞在支架材料上的活性状态。DiI 荧光标记为构建工程化软骨的体外和体内观察提供了简便,准确的示踪方法。

[参考文献]

- [1] FUCHS J R, NASSERI B A, VACANTI J P. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction[J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 72(2): 577-591.
- [2] SWIFT M J, CRAGO P E, GRILL W M. Applied electric fields accelerate the diffusion rate and increase the diffusion distance of DiI in fixed tissue[J]. *J Neurosci Methods*, 2005, 141(1): 155-163.
- [3] HONIG M G, HUME R I. Fluorescent carboyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures[J]. *J Cell Biol*, 1986, 103(1): 171-187.
- [4] 钱世昆, 张天顺, 肖晓琴, 等. DiI 荧光示踪剂在大鼠脾内肝细胞移植中的研究[J]. *中华器官移植杂志*, 2000, 21(6): 337-338.
- [5] 王超锋, 王 臻, 徐尚龙, 等. DiI 荧光标记的骨髓基质干细胞与支架材料复合后观察研究[J]. *科技技术与工程*, 2007, 7(2): 164-168.
- [6] 张云松, 高建华, 鲁 峰. 荧光活性染料 DiI 标记人脂肪干细胞[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(15): 2897-2899.
- [7] GULLAPALLI R R, DEMIREL M C, BUTLER P J. Molecular dynamics simulations of DiI-C18(3) in a DPPC lipid bilayer[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2008, 10(24): 3548-3560.
- [8] 赖文玉, 岑丹阳, 曾巧慧, 等. 骨髓间充质干细胞两种示踪方法的优缺点比较[J]. *中山大学学报*, 2009, 30(2): 232-236.
- [9] 操石磊, 张春礼, 徐 虎, 等. DiI 荧光标记示踪兔皮肤成纤维细胞修复前交叉韧带损伤的研究[J]. *科技技术与工程*, 2008, 8(1): 30-33.
- [10] SAKAI T, LI R K, WEISEL R D, et al. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury[J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68(6): 2074-2081.
- [11] GERASHCHENKO B I, HOWELL R W. Flow cytometry as a strategy to study radiation induced bystander effects in co-culture systems[J]. *Cytometry A*, 2003, 54(1): 1-7.
- [12] 黄晓峰, 张远强, 张英起. 荧光探针技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2004: 248-250.
- [13] HEMMRICH K, MEERCH M, von HEIMBURG D, et al. Applicability of the dyes CFSE, CM-DiI and PKH26 for tracking of human preadipocytes to evaluate adipose tissue engineering[J]. *Cells Tissues Organs*, 2006, 184(3-4): 117-127.
- [14] KIKKAWA Y S, PAWLOWSKI K S. Cochlear neuronal tracing for frequency mapping with DiI, NeuroVue, and Golgi methods[J]. *Acta Otolaryngol Suppl*, 2007, 12(559): 19-23.

[责任编辑:陈咏梅]

《暨南大学学报(自然科学与医学版)》 荣获“2009 年全国高校科技期刊优秀编辑质量奖”

2009 年 10 月 20 日,中国高等学校自然科学学报研究会组织开展了 2009 年全国高校科技期刊优秀编辑质量奖、优秀编辑工作者及优秀编辑学论著的评比活动。我校学报编辑部在此次活动中荣获多种奖项:

《暨南大学学报(自然科学与医学版)》荣获“2009 年全国高校科技期刊优秀编辑质量奖”。

黄建军副主编荣获“2009 年全国高校科技期刊优秀编辑工作者”称号。

王景周同志撰写的《论模糊语言在编辑稿件处理中的应用》荣获“2009 年全国高校科技期刊优秀编辑学论著一等奖”。

刘蔚绥同志撰写的《人力资源是影响出版产业核心竞争力的重要因素》荣获“2009 年全国高校科技期刊优秀编辑学论著二等奖”。

(暨南大学学报编辑部)