

Cellaris™ 670荧光探针 用于移植干细胞的长期体内监测

RUO-APP-001-zh-CN rev 1

摘要

干细胞移植是再生医学的重要组成部分。移植干细胞的长期体内追踪是理解其分布、功能及命运的关键。报告基因技术如今被广泛应用，但其操作通常费时费力。本文介绍了一种用于标记和监测脂肪源干细胞的方法 - 使用生物相容的Cellaris™ 670 (Luminicell)纳米粒子荧光探针标记干细胞，在移植后长达42天内追踪体内荧光信号。这一解决方案具备卓越的亮度、光稳定性以及对于各种生物过程的耐受性，因而能够实现持久的信号检测。其信号追踪的持续时间之久，在外源性荧光素中尤为卓越，展现了其在干细胞监测和其他应用中的巨大潜力。

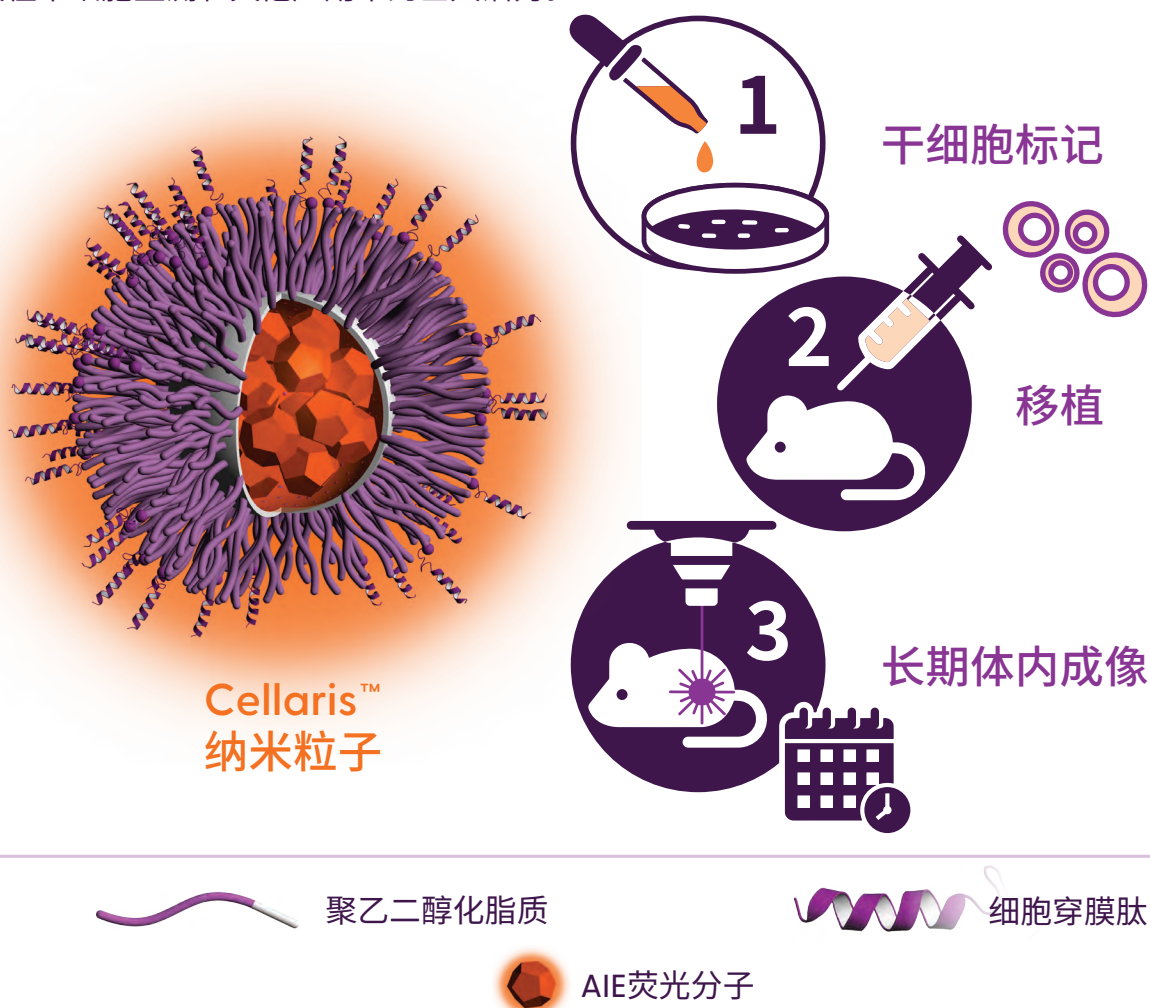


图1. 穿膜肽修饰的Cellaris纳米颗粒用于荧光标记干细胞及长期体内追踪的实验过程示意图。

引言

了解和监测干细胞移植后的长期体内分布及命运，对于推动干细胞治疗技术的发展至关重要。长期以来，基因编辑技术被广泛用于细胞标记，例如向受体细胞导入萤光素酶或绿色荧光蛋白 (GFP) 报告基因。但这类方法通常过程复杂并且十分耗时。

几十年来，荧光染料作为细胞染色或标记的工具，被大量应用于体外/离体/体内短期标记。然而，对于荧光染料，体内长期成像目前仍然是一个巨大挑战。大多数荧光染料都易被光漂白，经过长时间或反复照射，特别是激光照射后，其荧光信号会显著减弱，无法长期观测。虽然量子点 (QDs) 被认为具有较好的光稳定性，但其大多含重金属元素，可能对所研究的生物体造成毒性，因此不适用于生物体内应用。如果荧光染料能够同时具备高标记效率、亮度、光稳定性以及生物相容性等特性，且对标记过程及生物过程具有适应性，那么其作为标记方法的简便性和实用性将优于基因编辑 (图1)。

Cellaris是一种基于有机荧光纳米粒子的平台技术，包含具有独特聚集诱导发光 (AIE) 特性的荧光分子。与传统小分子染料的聚集导致荧光淬灭不同，Cellaris包含的AIE荧光分子在聚集时荧光大幅度增强。AIE荧光分子被封装进纳米粒子，产生极高强度的荧光，同时具备生物相容性，并被赋予可被细胞摄取的特性¹。Cellaris旨在同时具备生物相容性、超亮荧光、卓越的光稳定性和信号持久性等优势，能够实现活细胞荧光标记，并用于长程研究，尤其适用于长期活体成像²。Cellaris提供多种不同波长的解决方案，其中，Cellaris 670具有远红荧光，发射波长与Cy5、Cy5.5、Alexa Fluor 647/660/680相近，但被蓝光和绿光激发 (最大激发波长506 nm，最大发射波长670 nm)。纳米颗粒平均直径为30 nm。

实验方法

细胞分离和培养

1. 从8-12周龄雄性小鼠的腹部和腹股沟脂肪组织中分离出脂肪源性干细胞 (ADSCs)。
2. 使用含有20% FBS和1%青霉素-链霉素的 α -MEM培养基在体外培养分离出的细胞，并将细胞置于含5% CO₂的湿润培养箱中。
3. ADSCs第三代培养细胞用于后续标记和成像实验。

细胞标记及体外成像

1. 根据应用需求，将ADSCs培养在适合的容器

中。

2. 当细胞生长至80%融合度时，移去培养基，并用无菌的1×PBS洗涤细胞。
3. 用新鲜培养基稀释Cellaris原液 (200 nM) 制备浓度为1 nM的工作染液，通过涡旋振荡混合均匀。其他细胞追踪产品 (PKH26及QD655) 分别按照供应商推荐的浓度 (即2 μ M和1 nM) 用于细胞单独染色。
4. 将标记溶液加入细胞中，在37 °C细胞培养箱中孵育4小时。
5. 将贴壁细胞用培养基洗两次。
6. 将标记的细胞用共聚焦激光扫描显微镜 (TSC SP8, Leica) 进行成像，激发波长为543 nm，荧光信号收集范围560-800 nm。使用流式细胞仪 (Becton Dickinson) 评估标记细胞的荧光强度，激发波长为488 nm，发射由680/20 nm带通滤光片收集。

细胞移植及体内追踪

1. 在8周龄的BALB/c雌性小鼠 (n=8) 上建立缺血性后肢模型。
2. 将Cellaris 670标记的ADSCs (1 × 10⁶) 封装在Matrigel基质胶中 (每只小鼠30 μ L)。
3. 将准备好的含ADSCs的Matrigel肌肉内注射到每只小鼠的缺血性后肢中。
4. 分别在注射后的第1、7、15、25和42天对小鼠进行麻醉和成像。荧光成像在Maestro EX成像仪 (Cambridge Research & Inst.) 上进行：激发波长523 nm，发射接收波长560-900 nm (10 nm间隔，200 ms曝光时间)。对于生物发光成像，在用于荧光成像的同一只小鼠中腹腔注射D-萤光素 (150 mg/kg)，并用小动物活体成像仪IVIS Lumina II (Revvity, 原Xenogen) 进行成像，扫描时间从1秒至5分钟不等。

结果与讨论

体外细胞成像

本研究评估了Cellaris 670的体外细胞标记效率和亮度，并与两种常用的商业化细胞追踪剂 - PKH26 (细胞膜染料) 和QD655 (量子点材料) 进行了对比。

使用不同的细胞追踪产品分别标记ADSCs后，继续传代培养1至5天。培养1天后，通过共聚焦显微镜，所有标记的ADSCs都可观察到荧光信号，其中，Cellaris标记的ADSCs显示出最亮的荧光亮度 (图2)。5天后，PKH26和QD655标记的细胞仅

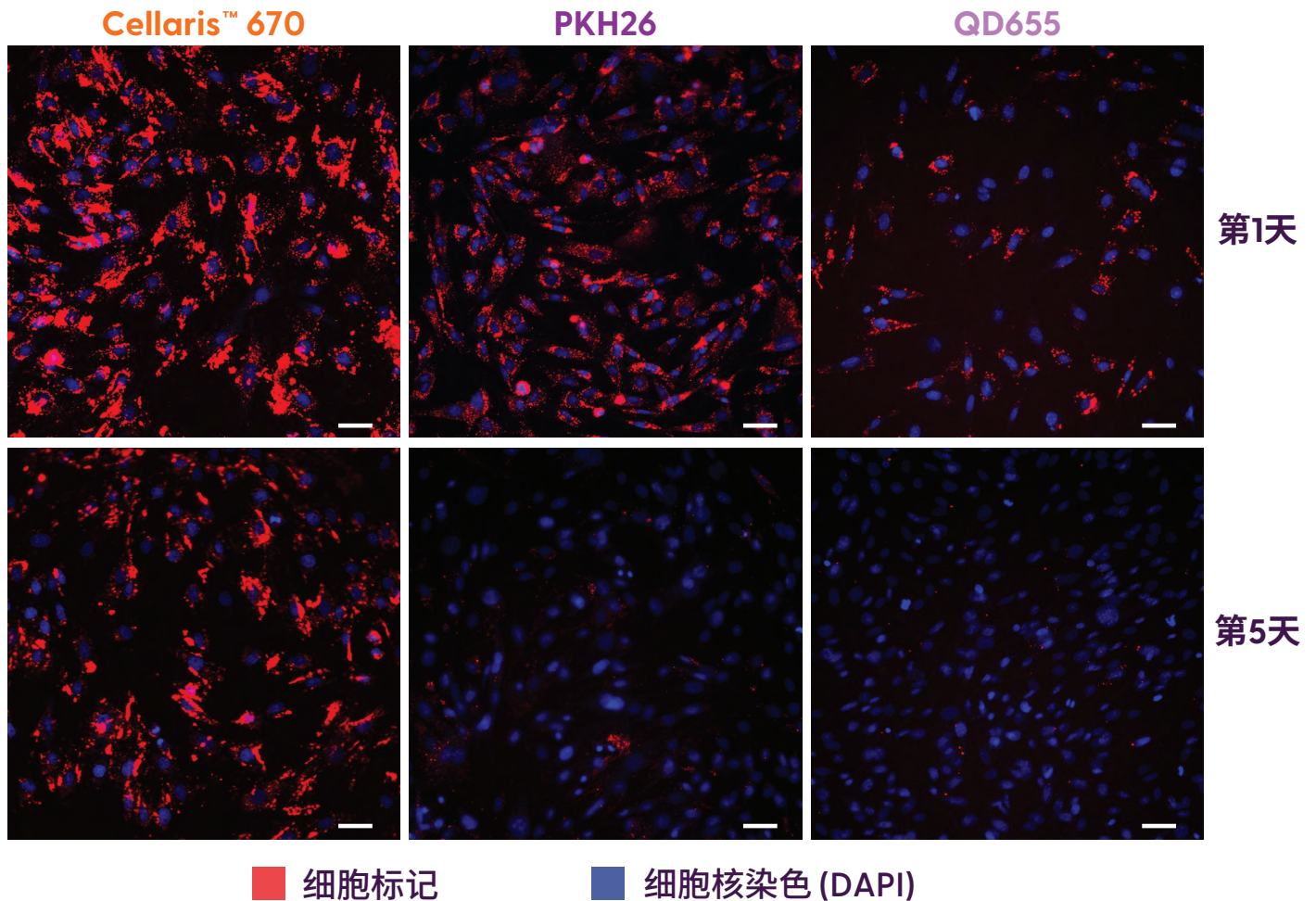


图2. Cellaris 670 (1 nM)、PKH26 (2 μ M) 和QD655 (1 nM) 标记的ADSCs在体外培养1天和5天后的共聚焦显微镜图像(激发波长543 nm, 发射接收波长560-800 nm)。标尺为25 μ m。

可观察到微弱的荧光, 而Cellaris 670标记细胞的荧光信号明显更亮。

使用流式细胞术定量检测Cellaris 670的细胞标记率、荧光亮度和信号持久性(图3)。在第1天时, Cellaris 670标记细胞的荧光强度最优, 同时显示出极高的细胞标记率(98.5%), 与PKH26 (97.5%) 相当, 而明显高于QD655 (80.6%)。到第5天, 即使经过多次细胞分裂, ADSCs保留的Cellaris 670信号仍显著更高(92.5%), 而PKH26和QD655标记的ADSCs则分别降至43.9%和12.4%, 这表明染料被光漂白或清除。这些结果与共聚焦成像的观察一致, 即Cellaris 670显示出更高的亮度和更优的信号持久度。

体内细胞追踪

接下来在小鼠缺血后肢模型中验证Cellaris 670用于体内细胞追踪的效果。在本研究中, ADSCs来自8-12周龄的FVB-Luc-GFP转基因小鼠的腹部和腹股沟脂肪组织, 表达荧光素酶和GFP(本研究未使用)²。利用生物发光成像技术观测小鼠体内ADSCs的生物分布情况, 作为对照评估Cellaris 670。

在移植近一个半月后, 由荧光素酶生物发光强度降低可知, 仅有一部分移植的细胞保持活性。在整个研究过程中, Cellaris 670标记ADSCs的荧光强度变化(图4)与荧光素酶的生物发光强度变化相吻合, 并且在第42天仍然可以被检测到。这证明Cellaris 670能够精确报告移植的ADSCs的体内分布情况。移植干细胞的命运, 例如迁移和分化情况, 其研究结果于别处呈现²。在此, 已经证明, Cellaris的荧光足够亮且稳定, 可以作为荧光素酶标准方法的替代策略。此外, Cellaris为生物医学研究提供了新的可能, 可以更简单、更快速、成本更低地研究细胞移植而无需基因工程改造。由于干细胞通常不易被基因转染, 且存在改变其特性的担忧, 因此, 本文展示的细胞标记方法对于干细胞具有特别意义。

总结

本文中, Cellaris 670纳米粒子用于干细胞标记以及移植干细胞的长期体内荧光追踪。因其超高亮度的远红发射以及优越的信号持久性和生物相容性, Cellaris 670可作为长期监测活体动物中移植细胞的有效工具。Cellaris 670能够精确追

踪移植细胞, 该性能已经过荧光素酶报告基因验证。我们希望其卓越的细胞追踪时间 (42天) 能够帮助研究人员揭示体内细胞行为的奥秘。并且我们认为, Cellaris有望实现更长的持续追踪时间。除干细胞应用³⁻⁶, Cellaris也被成功用于其他类型移植细胞的长期体内监测, 包括但不限于用于肿瘤免疫治疗的异种细胞^{7,8}和人类胚胎干细胞衍生的神经元⁹。我们预见Cellaris将为再生医学领域和治疗干预措施的发展做出更多贡献。

致谢

本文报告的结果主要基于此前已发表的研究成果², 已获得作者及美国化学学会的授权。

封面图

标题背景图片展示的是Cellaris 670标记的HeLa细胞。

参考文献

1. Feng, G.; Tay, C. Y.; Chui, Q. X. et al. Ultrabright Organic Dots with Aggregation-Induced Emission Characteristics for Cell Tracking. *Biomaterials* 2014, 35 (30), 8669-8677. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.023.
2. Ding, D.; Mao, D.; Li, K. et al. Precise and Long-Term Tracking of Adipose-Derived Stem Cells and Their Regenerative Capacity via Superb Bright and Stable Organic Nanodots. *ACS Nano* 2014, 8 (12), 12620-12631. DOI: 10.1021/nn505554y.
3. Rojas-Torres, M.; Jiménez-Palomares, M.; Martín-Ramírez, J. et al. REX-001, a BM-MNC Enriched Solution, Induces Revascularization of Ischemic Tissues in a Murine Model of Chronic Limb-Threatening Ischemia. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020, 8, 602837. DOI: 10.3389/fcell.2020.602837.
4. Salvatore, G.; De Felici, M.; Dolci, S. et al. Human Adipose-Derived Stromal Cells Transplantation Prolongs Reproductive Lifespan on Mouse Models of Mild and Severe Premature Ovarian Insufficiency. *Stem Cell Res. Ther.* 2021, 12 (1), 1. DOI: 10.1186/s13287-021-02590-5.
5. Dahal, S.; Dayal, S.; Androjna, C. et al. Adult Mesenchymal Stem Cells and Derivatives in Improved Elastin Homeostasis in a Rat Model of Abdominal Aortic Aneurysms. *Stem Cells Transl. Med.* 2022, 11 (8), 850-860. DOI: 10.1093/stcltm/szac043.
6. Kojima, H.; Kushige, H.; Yagi, H. et al. Combinational Treatment Involving Decellularized Extracellular Matrix Hydrogels with Mesenchymal Stem Cells Increased the Efficacy of Cell Therapy in Pancreatitis. *Cell Transplant.* 2023, 32. DOI: 10.1177/09636897231170437.

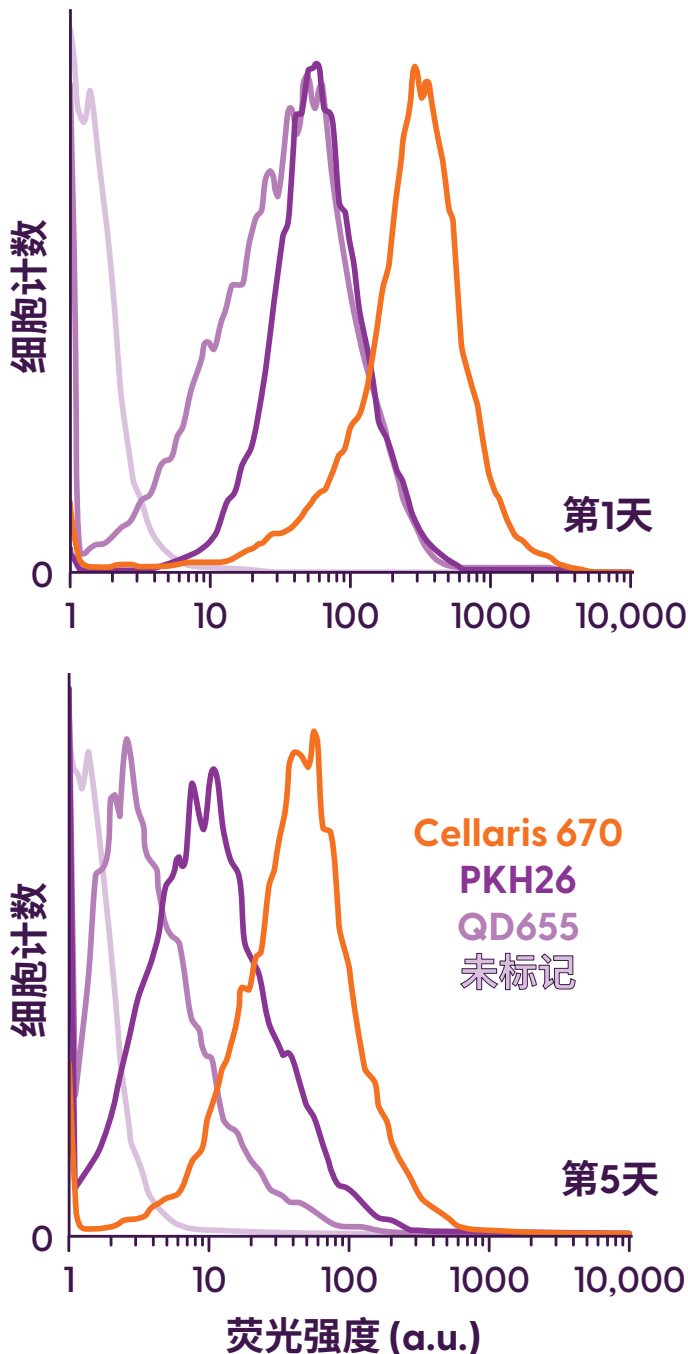


图3. Cellaris 670 (1 nM, 橙色)、PKH26 (2 μ M) 和QD655 (1 nM) 标记的ADSCs在标记后第1天和第5天的流式细胞结果。未标记的ADSCs作为阴性对照 (浅紫色)。

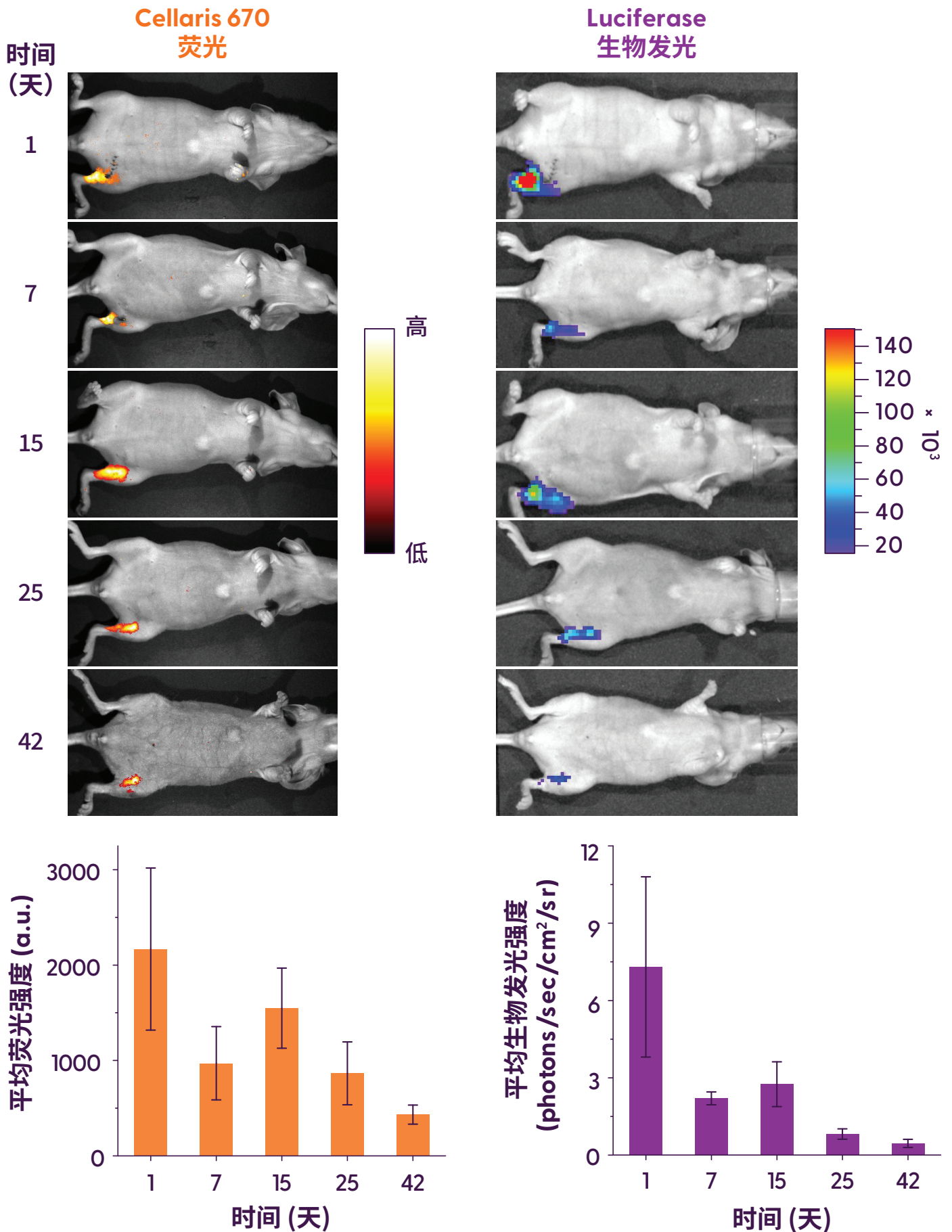


图4. 缺血性后肢小鼠注射Cellaris 670标记的ADSCs不同时间后的活体荧光成像和生物发光成像代表图, 以及感兴趣区域内对应的荧光和生物发光强度变化, 图示为8只小鼠数据的平均值。

7. Huang, C. P.; Liu, L. C.; Chang, C. C. et al. Intratumoral Xenogeneic Tissue-Specific Cell Immunotherapy Inhibits Tumor Growth by Increasing Antitumor Immunity in Murine Triple Negative Breast and Pancreatic Tumor Models. *Cancer Lett.* 2022, 545, 115478. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.10.044.
8. Huang, C. P.; Lu, H. L.; Shyr, C. R. Anti-tumor Activity of Intratumoral Xenogeneic Urothelial Cell Monotherapy or in Combination with Chemotherapy in Syngeneic Murine Models of Bladder Cancer. *Am. J. Cancer Res.* 2023, 13 (6), 2285. PMID: PMC10326576.
9. Jang, S. E.; Qiu, L.; Cai, X. et al. Aggregation-Induced Emission (AIE) Nanoparticles Labeled Human Embryonic Stem Cells (hESCs)-Derived Neurons for Transplantation. *Biomaterials* 2021, 271, 120747. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.120747.

细胞标记试剂盒

产品名称 ¹	激发波长 (nm)	产品编号	产品规格				
			试剂体积 ² (μL)			表面功能化	
			100	250	500	编号	功能修饰
Cellaris 506	355	LCTC-506	100	250	500	01	CPP ³
Cellaris 540	423	LCTC-540					
Cellaris 670	506	LCTC-670					
Cellaris 810	635	LCTC-810					
Cellaris 1010	725	LCTC-1010					

注

1. 产品名称分别对应其在水中的最大荧光发射波长。各产品最佳激发波长列在表中。
2. 体积100 μL、250 μL和500 μL的产品可分别用于20、50和100次实验。
3. 纳米颗粒表面做聚乙二醇 (PEG) 化处理, 并用细胞穿膜肽 (CPP) 修饰, 用于提高细胞摄入。其他表面功能基团可按客户需求定制。

Luminicell Pte. Ltd.

28 Ayer Rajah Crescent, #06-05
Singapore 139959

电话 +65 8808 2159

官网 <https://luminicell.com>

邮箱 info@luminicell.com

注册信息

UEN 201413325H

luminicell

