论著

文章编号:1000-5404(2008)20-1948-04

纳米磁性探针转染大鼠外周血内皮祖细胞的磁共振成像实验研究

曹爱红[1,2],石红建[1],聂 芳[1],杨 芳[3],滕皋军[1] (东南大学:[1]附属中大医院放射科,江苏省分子影像与功能影像实验室,[3]生物科学与医学工程系,南京 210009;[2]徐州医学院第二附属医院放射科,江苏 徐州 221006)

摘 要:目的 建立稳定的体外分离培养、诱导分化大鼠外周血内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs),及应用纳米磁探针体外标记EPCs的方法,磁共振(MR)进行标记细胞成像。**方法** 抽取SD大鼠外周血,应用Ficoll密度梯度离心的方法获得单个核细胞,同时应用VEGF和bFGF诱导,使之向内皮细胞分化,以免疫细胞化学鉴定贴壁细胞的内皮标志。制备Fe_2O_3-arginine复合物,对EPCs进行磁探针标记,应用MR进行细胞群成像。**结果** 经VEGF和bFGF诱导后的EPCs的内皮标志CD31、CD34、Flk21和vWF在不同时段呈阳性表达。普鲁士蓝染色可见铁颗粒位于细胞质内,标记率接近100%;磁共振成像(MRI)显示标记的细胞群信号强度的变化较未标记细胞群信号降低。**结论** 大鼠外周血中含有EPCs,在体外特殊诱导环境下,可定向分化为内皮样细胞。Fe_2O_3-arginine可以有效标记EPCs构建纳米生物探针,临床应用型1.5T MR可在体外进行标记细胞群成像。

关键词: 内皮祖细胞;纳米生物探针;内皮细胞;分化;离体;标记;磁共振成像

中图法分类号: R329.2;R331.1;R445.2 **文献标识码:** A

Magnetic resonance imaging of endothelial progenitor cells from rat peripheral blood labeled with nano-bioprobe of superparamagnetic iron oxide

CAO Ai-hong[1,2], SHI Hong-jian[1], NIE Fang[1], YANG Fang[3], TENG Gao-jun[1] ([1]Department of Radiology, Jiangsu Key Laboratory of Molecular Imaging and Functional Imaging, Zhong Da Hospital; [3]School of Biological Sciences and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210009; [2]Department of Radiology, The Second Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou Jiangsu 210006, China)

Abstract: Objective To investigate the isolation, culture, proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells (EPCs) from rat circulating blood and to study of magnetic resonance imaging of nano-bioprobe that was constructed with endothelial progenitor cells and superparamagnetic iron oxide (SPIO). **Methods** The mononuclear cells (MNCs) were isolated from SD rat peripheral blood, and EPCs were selected by adherence method. Then the expressions of cell markers of EPCs were assessed by immunohistochemistry. EPCs were incubated with Fe_2O_3-arginine for 24 h, then intracellular iron was detected by Prussian blue stain and the cells underwent *in vitro* MR imaging with three sequences (T_1WI, T_2WI, T_2*WI). **Results** Immunocytochemical stain showed that the adherent cells were positive for CD31, CD34, Flk21 and vWF 4 d after adherent culture. Iron-containing intracytoplasmatic vesicles could be observed clearly with Prussian blue staining, and the labeling rate of EPCs were nearly 100%. The signal intensity on MRI was significantly decreased in labeled EPCs compared with unlabeled cells. **Conclusion** EPCs can be obtained from mononuclear cells in rat peripheral blood and be differentiated into endothelial cells. EPCs can be labeled with Fe_2O_3-arginine to construct nano-bioprobe *in vitro* without significant changes in viability and proliferation. The labeled EPCs can be imaged with standard 1.5 T MR equipment.

Key words: endothelial progenitor cells; nano-bioprobe; endothelial cells; differentiation; isolation; labeling; magnetic resonance imaging

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(90606007)

Supported by the Major Program of the National Natural Science Foundation of China (90606007)

作者简介: 曹爱红,男,江苏省泰州市人,硕士,副主任医师,主要从事分子影像学及肺部肿瘤方面的研究,发表论文8篇。E-mail:caooh@163.com

通信作者: 滕皋军,E-mail:gjteng@vip.sina.com

收稿日期: 2008-07-15;**修回日期:** 2008-08-25

分子影像的核心技术之一就是构建探针。实际上,正是由于探针的大规模研发才使得分子影像从一项技术转变为一门学科,合成和检测各种探针是分子影像学研究中最热点、最前沿的问题[1]。近年来,随着分子影像学的蓬勃发展,开展磁性对比剂超顺磁性氧化铁[2-4](superparamagnetic iron oxide, SPIO)标记干细胞构建纳米生物探针,已经成为从事该领域工作的研究人员必须掌握的基本技术之一。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是能分化为内皮细胞(endothelial cells, ECs)的前体细胞,在内皮修复和血管新生中起重要作用[5,6]。近年来国内、外开展了大量 EPCs 移植治疗心血管疾病的研究,但尚未建立一种有效的活体疗效评价手段。分子影像的目的就在于通过设计特定的探针,靶向成像,为临床提供活体示踪和疗效评价的方法。本实验旨在建立稳定的体外分离培养诱导分化大鼠外周血内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的方法,应用纳米磁探针三氧化二铁(Fe_2O_3)-精氨酸(arginine)复合物体外标记 EPCs,通过磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)手段进行检测,为分子影像学构建纳米生物探针。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　健康雄性 SD 大鼠 6 只,体质量 250 ~ 350 g,由东南大学医学院动物房提供。

1.1.2　主要试剂　　Histopaque-1077(Sigma,美国)密度梯度离心液,人血浆纤维连结蛋白(Fibronectin,FN)(Chemicon,美国),内皮细胞基础培养液(EGM-2)。Single Quots 组合添加剂(Lonza,美国),胰蛋白酶(Sigma,美国),四氮噻唑蓝(MTT,Fluka,美国),二甲基亚砜(DMSO,上海生工生物工程有限公司),AnnexinV-异硫氰酸荧光素(FITC)凋亡检测试剂盒(凯基生物工程有限公司),胎牛血清(FBS,杭州四季青生物工程材料研究所),兔抗 CD31 抗体、兔抗 CD34 抗体和抗 Flk21 抗体为 Santa Cruz Biotechnology 公司产品,兔抗 vWF 抗体为 DAKO 公司产品,S-P 9000 免疫组化染色试剂盒(Zymed 公司,美国)。

1.1.3　主要设备　　CO_2培养箱(Herabus,德国),倒置相差显微镜(Zeiss Axiovert25 CFL,德国),流式细胞仪(FACSCalibur,Becton Dickinson,加拿大),紫外分光光度计(Beckmen,美国),净化工作台(吴江市生化净化设备厂)。1.5T MRI 成像设备(Phillips 公司,Eclipse 机型,荷兰)。

1.2　方法

1.2.1　大鼠外周血 EPC 的体外分离培养　　心脏穿刺采集正常 SD 大鼠外周血约 10 ml,肝素抗凝,磷酸缓冲液(PBS)以 1∶1 稀释,密度梯度离心法(Histopaque-1077)400 × g 离心 30 min,吸取中间云雾状单个核细胞(mononuclear cells, MNCs)层,PBS 洗涤 2 次,EGM-2 完全培养液重悬,接种于包被纤维连接蛋白(FN)的 25 ml 培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱培养。4 d 后换液,弃未贴壁细胞,加入新鲜培养液继续培养,此后每隔 4 d 更换培养液,大约于接种后 10 d 左右,贴壁细胞即近乎完全铺满培养皿底。0.25% 胰蛋白酶消化后进行传代培养。培养过程中用倒置相差显微镜对培养细胞进行动态观察,多次换液传代使 EPCs 得以纯化,P5 代时用于实验。

1.2.2　大鼠外周血 EPCs 的鉴定　　选取生长良好的原代细胞,自第 1 ~ 7 天,每天取 3 个 4 孔板用 40 g/L 多聚甲醛固定,以免疫组化染色法鉴定贴壁内皮细胞的标志 CD31、CD34、Flk21 和 vWF。方法:用 PBS 清洗培养皿 3 次,然后用甲醛固定 2 次,每次 20 min;爬片后再用 PBS 清洗 2 次,双氧水-甲醛孵育 35 min,PBS 洗涤 10 min,牛血清工作液封闭非特异性抗原 30 min;分别加入鼠抗人 CD31、CD34 及兔抗人 Flk21 及 vWF 单克隆抗体(1∶50),37 ℃孵育 2 h,PBS 漂洗 2 次,每次 3 min;滴加生物素标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗,37 ℃孵育 20 min,PBS 漂洗3 次,每次 35 min;滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液(S-A/HRP),PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;DAB 显色,充分冲洗,苏木精复染后梯度脱水,二甲苯封片后,在激光共聚焦显微镜下观察结果并扫描。实验中以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.3　SPIO 制备　　氧化铁纳米粒子的合成并与精氨酸(arginine)偶联:nano-Fe_2O_3-arginine 水基磁性液体由东南大学生物科学与医学工程系顾宁教授研究组提供:在 N2 保护下制备 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 混合溶液,pH = 1.7,将 1.5 mol/L 的氨水剧烈搅拌下缓慢滴入其中,直至 pH = 9,反应 30 min,生成黑色沉淀。将生成物用永磁铁分离出来,去离子水反复清洗。最后定容为 16 g/L浓度的 Fe_3O_4 水基磁流体。在酸性条件下用 $Fe(NO_3)_3$ 进行氧化(90 ℃下)得到 Fe_2O_3 水基磁流体,磁分离法洗涤,去离子水定容浓度为 16 g/L。称量 87 mg 精氨酸用少量水溶解之,取 50 ml 新合成的 Fe_2O_3 水基磁流体(浓度为 16 g/L),去离子水定容至 400 ml,调 pH 至 2.7;两者混合,充分搅拌,组装 4 h 后停止反应。超声、磁分离洗涤 4 次,定容至 400 ml 即得到 nano-Fe_2O_3-arginine 水基磁性液体,测量浓度为 2 g/L。

1.2.4　EPCs 磁探针标记构建纳米生物探针　　将 Fe_2O_3-arginine 加入 P5 代 EPCs 培养液中进行标记,37 ℃、5% CO_2 培养箱内孵育 24 h,根据文献[7,8]及预实验,铁终浓度为 25 μg/ml。除去培养液后用 PBS 反复冲洗后,10% 的甲醛溶液固定 20 min。进行普鲁士蓝染色:2% 亚铁氰化钾孵育,快红复染,显示细胞轮廓及细胞内铁颗粒。

1.2.5　MTT 比色法检测 EPCs 磁探针标记后 EPCs 活力　　台盼蓝拒染法观察标记组、未标记组细胞活率。标记后 3、4、5 d 动态观察标记组、未标记组细胞生长增殖状况。

1.2.6　膜联蛋白(Annexin V)/碘化吡啶(PI)双染色法检测细胞凋亡　　收集磁粒子标记的 EPCs、未标记 EPCs 各 1×10^6 个,冷 PBS 洗涤 3 遍,50 μl × AnnexinV 结合缓冲液重悬细胞,加入 Annexin V-FTIC 5 μl 室温避光静置 10 min 后,加入 10 μl PI 室温避光静置 5 min,预冷的 PBS 洗涤 1 遍,加入 300 μl × Annexin 结合缓冲液重悬细胞后,即在流式细胞仪上检测,以 $Annexin^+/PI^-$ 判断为早期凋亡,$Annexin^+/PI^+$ 判断为晚期凋亡或死亡。

1.2.7　磁共振对细胞群的体外成像　　将磁粒子标记的 P5 代 EPCs、及未标记 P5 代 EPCs 用 0.25% 胰蛋白酶消化后收集、

离心,重悬于0.5 ml 1%琼脂糖的Ependoff管中,标记的EPCs分2组(分别为标记后分别培养1、7 d),细胞数目各有2个不同等级(1×10^5个、1×10^6个)未标记细胞1×10^6个,共5个Ependoff管,另1个Ependoff管内为琼脂糖。细胞悬液的MR成像采用1.5T MR仪,表面线圈,内径12.7 cm;视野(FOV)13 cm×13 cm;激励次数2~4;层厚2 mm;矩阵256×256;测量信号强度,感兴趣区(ROI)取14.6 mm^2。成像序列:①梯度回波(SE)序列:T_1加权像(T_1WI),重复时间(TR)500.0 ms,回波时间(TE)17.9 ms。②快速自旋回波(FSE)序列:T_2加权像(T_2WI),TR 4 000 ms,TE 108 ms,回波链16。③梯度回波(FE)序列:T_2*WI,TR 620 ms,TE 15.7 ms,翻转角:35°。信号强度的改变用信号强度变化率△SI表示:$\triangle SI=(SI_{标}-SI_{未标})/SI_{未标}\times100\%$($SI_{标}$、$SI_{未标}$分别指标记细胞和未标记细胞的信号强度)。

1.3 统计学分析

使用SPSS 11.5统计软件对结果进行分析,3组之间采用方差分析,两两间比较采用SNK-q检验。

2 结果

2.1 体外培养的EPCs的形态学变化

新鲜分离的外周血单核细胞呈圆形,体积较小,浮于培养液中。第2天在倒置相差显微镜下观察细胞开始变大,并明显贴壁。第3、4天可观察到细胞明显贴壁增殖,7~10 d出现多个细胞团,贴壁的细胞呈梭形,出现典型的线样排列。继续培养至14 d,贴壁细胞由小圆形变成大圆形,呈现出"铺路石"样的成熟内皮细胞形态特征。

2.2 贴壁细胞的免疫组化染色鉴定

细胞贴壁后,用免疫组化染色法检测CD31、CD34、Flk21及vWF表达的细胞。在镜下随机选取3个视野计数$CD31^+$、$CD34^+$、$Flk21^+$、vWF^+的细胞。每个视野至少计数200个细胞。这些标志在细胞生长的不同时段表达不一,CD31在培养的第3天开始表达为(26.0±3.1)%,第5天最强为(91.2±4.1)%,以后表达迅速减弱,于第7天消失。CD34在培养的第3天开始表达为(15.0±4.1)%,第5天最强为(93.3±3.3)%,以后表达迅速减弱,第7天消失。第4天时,Flk21开始表达为(37.0±3.2)%,以后逐渐增强。到第4天时vWF的表达为(46.3±3.1)%。第7天时,Flk21和vWF的表达均为100%。

2.3 Fe_2O_3-arginine纳米粒子

形状接近球形,平均直径为17 nm,具有立方尖晶石的晶体结构,饱和磁化强度Ms=36.8 emu/g。

2.4 EPCs磁粒子标记后普鲁士蓝染色

标记的EPCs细胞质内均可见蓝色颗粒,且标记率都接近100%,而未标记细胞内无蓝色颗粒。

2.5 标记对细胞活力及增殖的影响

台盼蓝染色计数显示标记和未标记活细胞数目在93.5%左右,在Fe_2O_3-arginine的培养基中EPCs可继续增殖,细胞形态无明显变化。

2.6 MTT比色试验

标记的EPCs和未标记EPCs在不同时间的吸光度值见表1。2组细胞间比较差异无统计学意义($P>0.05$)

表1 MTT法测得标记、未标记细胞不同时间的吸光度值($\bar{x}\pm s$)

组别	3 d	4 d	5 d
标记组	0.206±0.017	0.297±0.011	0.353±0.017
未标记组	0.203±0.015	0.296±0.013	0.354±0.005
P值	0.564	0.523	0.573

2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

EPCs磁粒子标记后3 d后应用流式细胞分析仪检测细胞凋亡。结果显示标记的细胞及未标记细胞的早期凋亡细胞分别为(6.85±1.42)%、(6.72±1.22)%,晚期凋亡和死亡细胞分别为(0.23±0.04)%、(0.24±0.05)%,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.8 磁共振成像

用T_1WI、T_2WI、T_2*WI序列分别对磁粒子标记后1、7 d的不同数量的标记细胞进行成像,各序列信号强度变化率(△SI)见表2,标记的细胞不同天数、不同数量级比较,细胞信号改变均有统计学意义($P<0.05$)。3个序列中以T_2*WI的信号强度变化率最大,T_2WI次之,T_1WI变化最小。

表2 不同数量的标记EPCs细胞在MRI各序列上的信号强度变化率(%,$\bar{x}\pm s$)

标记时间	细胞数量	信号强度变化率		
		T_1WI	T_2WI	T_2*WI
标记后1 d	1×10^6个	−42.3±2.2	−87.6±1.3	−94.8±0.8
	1×10^5个	−17.1±2.8	−60.5±1.2	−71.1±1.2
标记后7 d	1×10^6个	−8.8±0.2	−82.1±1.8	−78.9±0.8
	1×10^5个	−5.8±1.6	−28.3±2.3	−44.8±2.1

3 讨论

近年来,分子影像学作为一门新兴的交叉学科取得蓬勃发展,国外以美国为首的科研大国对本学科的发展给予高度关注,正在加紧投入分子影像学的基础研究,而我国在本领域尚无突破性的研究成果[1]。Weissleder等[7]认为分子影像具有传统影像成像手段所不具有的优点:无创伤、实时、活体、特异、精细显像(分子水平)等,其中制备特异性高亲和力的靶向探针是活体分子显像的关键因素[8]。由于许多探针是穿过细胞膜进入细胞内或与细胞膜的特定位点相结合的,探针对细胞、细胞器、细胞内分子的生理功能可能会造成一定的影响,所以探针必须被证明是生物学安全的才能在动物和人体应用。

本研究所采用的纳米为SPIO;SPIO具有磁力矩,体积小,不能被晶格方向阻止,在磁场中单个磁力矩沿着磁场自由排列,形成单个自旋,加之网络力矩至少高于顺磁自旋集合4个量级,于是形成了可以使周围质子出现相位差的巨大微观磁场梯度,导致质子去相位的T_2弛豫加速,使组织T_2加权像信号显著降低,是一

种典型的 MR 阴性对比剂。在通过静脉注射进人体后,SPIO 主要是由人体网状内皮系统中的吞噬细胞摄取,聚集在网状内皮细胞丰富的组织和器官如肝、脾、淋巴结中[9]。在各种磁共振示踪剂中,SPIO 是一种较理想的 MR 对比剂,利用 SPIO 标记干细胞,用 MRI 进行活体示踪的研究已进行多年,而且技术也在不断完善,本实验室已应用 SPIO 成功标记了人脐血间充质干细胞、兔外周血内皮祖细胞,并用 MR 进行了标记细胞的体内、外示踪,均取得较理想的结果[10,11],但目前尚少见 SPIO 标记大鼠 EPCs 构建纳米生物探针的报道。

文献[12]报道 EPCs 在组织缺血、心肌缺血、血管外伤及脑卒中后,EPCs 活跃的参与了缺血后血管新生的过程。近年来,随着心脑血管疾病发病率的上升,EPCs 对动脉粥样硬化性疾病及心血管并发症的治疗性应用成为研究的热点。血管内皮损伤和功能失调是发生动脉粥样硬化的最初事件,同时也是血管成形术、支架术后再狭窄的一个重要的病理生理步骤,逆转失调的内皮功能成为多种血管损伤性疾病防治的新趋势[13]。研究表明,血管损伤后循环 EPCs 能够向损伤血管归巢,并定向分化为血管内皮细胞,加速损伤血管内皮的修复,维护内皮单细胞层的完整性,可防止血栓形成和动脉粥样硬化损伤的进展,因此,EPCs 在内皮损伤或功能不全的血管的修复中起重要作用[5,14,15]。

由于细胞膜、SPIO 均带负电荷,所以不经修饰的 SPIO 不能有效标记细胞。本实验采用带正电荷的精氨酸通过静电作用包裹纳米化处理的氧化铁颗粒,使带负电荷的细胞通过非特异性膜表面吸收过程摄取铁颗粒进入细胞内。

标记后 EPCs 的 MR 信号改变是 MRI 活体示踪的基础,而 MRI 信号的改变与对比剂种类、标记细胞数量、标记时间及标记率等多种因素有关。与未标记细胞相比,标记细胞在 T_1WI、T_2WI、T_2 * WI 3 个序列中信号均有降低,以 T_2 * WI 信号降低最明显(△SI 最大),这是由于 T_2 * WI 对磁化率的差异更敏感,铁引起的磁敏感效应更大。实验中对标记 7 d 和 1 d 的 1×10^6、1×10^5个细胞成像,3 个序列均显示细胞数量大、标记后培养时间短的信号强度变化率大,提示标记细胞数、标记后培养时间和信号强度间可能存在一定的比例关系。据此,从信号强度的变化程度可能推测细胞的多少及分裂速度,但其可靠性仍需进一步的研究来证实。

本研究所建立的大鼠 EPCs 培养诱导及标记构建纳米生物探针体系,为本实验室下一步开展 EPCs 移植治疗大鼠颈总动脉血管内膜损伤及动脉粥样硬化模型的 7.0 T micro-MRI 活体示踪研究提供了可靠的实验基础。

参考文献:

[1] 王宵英. 分子影像学进展及其应用[J]. 北京大学学报: 医学版, 2007, 39(5): 555 - 556.

[2] Frank J A, Miller B R, Arbab A S, *et al*. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents[J]. Radiology, 2003, 228(2): 480 - 487.

[3] Arbab A S, Bashaw L A, Miller B R, *et al*. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging[J]. Radiology, 2003, 229(3): 838 - 846.

[4] Matuszewski L, Persigehl T, Wall A, *et al*. Cell tagging with clinically approved iron oxides: feasibility and effect of lipofection, particle size, and surface coating on labeling efficiency[J]. Radiology, 2005, 235(1): 155 - 161.

[5] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology[J]. Circ Res, 2004, 95(4): 343 - 353.

[6] 麦筱莉, 滕皋军, 马占龙, 等. 外周血内皮祖细胞磁探针标记及体外磁共振成像的实验研究[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(9): 838 - 843.

[7] Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging[J]. Radiology, 2001, 219(2): 316 - 333.

[8] Daldrup-Link H E, Rudelius M, Piontek G, *et al*. Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment[J]. Radiology, 2005, 234(1): 197 - 205.

[9] Alfke H, Stoppler H, Nocken F, *et al*. *In vitro* MR imaging of regulated gene expression[J]. Radiology, 2003, 228(2): 488 - 492.

[10] Sun J H, Teng G J, Ju S H, *et al*. MR tracking of magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidneys with acute renal failure [J]. 2008, 17(3): 279 - 290.

[11] Ju S, Teng G J, Lu H, *et al*. *In vivo* MR tracking of mesenchymal stem cells in rat liver after intrasplenic transplantation[J]. Radiology, 2007, 245(1): 206 - 215.

[12] Walter D H, Rittig K, Bahlmann F H, *et al*. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. Circulation, 2002, 105(25): 3017 - 3024.

[13] Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease[J]. Clin Chim Acta, 2006, 368(1 - 2): 33 - 47.

[14] Bailey A S, Jiang S, Afentoulis M, *et al*. Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells[J]. Blood, 2004, 103(1): 13 - 19.

[15] Hill J M, Zalos G, Halcox J P, *et al*. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. N Engl J Med, 2003, 348(7): 593 - 600.

(编辑　王　红)