文章编号:1000-5404(2011)23-2445-05

论著

# Gd-BOPTA标记对人脐血内皮祖细胞生物学特性的影响与MR成像研究

王 博[1,2],方靖琴[1],王舒楠[1],陈金华[1],李 雪[1],张伟国[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所放射科[1];450052 郑州,郑州大学第一附属医院放射科[2])

[摘要] **目的** 探讨Gd-BOPTA标记人脐血内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的方法和对标记EPCs生物活性的影响,观察标记EPCs的体外磁共振成像特点。**方法** 应用密度梯度离心法结合贴壁筛选法分离培养EPCs。采用jetPEI™-FluoF介导Gd-BOPTA标记EPCs,比较不同标记浓度和标记时间对EPCs生物活性的影响,收集未标记细胞和标记24 h的细胞进行体外MR成像,比较不同浓度标记的细胞在不同扫描序列中的信号强度变化。**结果** 荧光显微镜下观察,标记的EPCs胞质内可见绿色荧光颗粒,透射电镜可见胞质内散在分布许多Gd颗粒,颗粒主要位于胞质的细胞器如高尔基体周围以及附着在细胞膜内层上。Gd-BOPTA标记规律呈"抛物线"样,即随着标记浓度增高和标记时间的延长,细胞内聚集的Gd颗粒增多,细胞的标记率也增高,但在浓度为25 μg/ml标记24 h标记率达峰值[(88.2±1.6)%]后,标记率逐渐降低。在标记浓度低于25 μg/ml标记24 h时,对细胞的黏附能力、迁移能力及增殖能力均无影响($P>0.05$)。在$T_1$WI序列最大相对信号强度出现在浓度为25 μg/ml时,而后信号降低,与对照管相比差异显著($P<0.05$),在$T_2$WI和$T_2$*WI序列上相对信号强度变化无显著性差异($P>0.05$)。**结论** jetPEI™-FluoF可介导Gd-BOPTA有效地标记EPCs,对MR信号的影响主要为$T_1$WI正性效应,最适标记浓度和最佳标记时间分别为25 μg/ml、24 h。

[关键词] 内皮祖细胞;细胞标记;生物活性;磁共振成像
[中图法分类号] R329.28; R445.2; R811.5 [文献标志码] A

# Effect of Gd-BOPTA labeling on cytobiological characteristics and magnetic resonance imaging of HUCB-derived endothelial progenitor cells *in vitro*

Wang Bo[1,2], Fang Jingqin[1], Wang Shunan[1], Chen Jinhua[1], Li Xue[1], Zhang Weiguo[1] ([1]Department of Radiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Radiology, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the method of labeling endothelial progenitor cells (EPCs) with Gd-BOPTA and cytobiological characteristics of Gd-BOPTA-labeled EPCs, and to explore imaging characteristics of the labeled cells by magnetic resonance imaging (MRI) *in vitro*, for providing experimental evidences for clinical application of EPCs transplantation. **Methods** EPCs were separated from human umbilical cord blood (HUCB) by density gradient centrifugation and adherence screening, and were cultured *in vitro*. EPCs were labeled with Gd-BOPTA *via* jetPEI™-FluoF, and the effects of different concentration of Gd-BOPTA and different incubation time on cytobiological characteristics of Gd-BOPTA-labeled EPCs were examined. Unlabeled EPCs and EPCs labeled for 24 h were collected for MRI examination, and signal intensities of EPCs labeled with different concentration of Gd-BOPTA in different scanning sequence were compared. **Results** Green fluorescence particles were found in the cytoplasm of Gd-BOPTA-labeled EPCs under fluorescence microscope, and numerous Gd particles mainly scattered around Golgi apparatus and attached to internal surface of cell membrane by transmission electron microscopy. The labeling pattern of Gd-BOPTA was parabolic, indicating that before the labeling concentration reached 25 μg/ml and the labeling time reached 24 h [(88.2±1.6)%, the peak level], the labeling efficiency and Gd particles were increasing, but after that the labeling efficiency and Gd particles decreased. At concentrations of 12.5, 25 and 37.5 μg/ml after labeling for 12 and 24 h, the labeling efficiency of Gd-BOPTA were (55.7±0.8)%, (80.8±0.5)%, (71.6±0.6)% and (67.4±1.7)%, (88.2±1.6)%, (73.2±2.2)%, respectively. The adhesion, migration and proliferation capacities of Gd-BOPTA-labeled EPCs showed no significant change when the labeling concentration was below

[基金项目] 教育部回国留学启动基金(教外司留[2010]1561号);第三军医大学回国人员启动基金(2009XHG14)
[通信作者] 张伟国,电话:(023)68757621

25 μg/ml ($P>0.05$). The maximal signal intensity (SI) of Gd-BOPTA-labeled EPCs in $T_1$WI sequence was obtained at the concentration of 25 μg/ml (161%), and it was significantly different from that of unlabeled EPCs ($P<0.05$). The △SI of Gd-BOPTA-labeled EPCs in $T_2$WI and $T_2$ * WI was not significantly different from that in $T_1$WI ($P>0.05$). **Conclusion** EPCs can be efficiently labeled with Gd-BOPTA *via* jetPEI™-FluoF. The major effect of Gd-BOPTA on MR imaging is in $T_1$WI positive sequence, the optimal labeling concentration of Gd-BOPTA is 25 μg/ml and the best labeling time is 24 h.

[**Key words**] endothelial progenitor cell; cell labeling; biological activity; magnetic resonance imaging

Supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Scholars of Ministry of Education ([2010]1561) and the Starting Fund for Personnel Returning from Overseas of Third Military Medical University (2009XHG14). Corresponding author: Zhang Weiguo, Tel:86-23-68757621

Asahara 等[1]首次从人外周血中分离到一类可以分化为成熟内皮细胞的特殊血细胞,将它命名为循环内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs),并利用小鼠模型证明了骨髓源性的EPCs参与了出生后血管生成。研究表明,EPCs在血管组织工程、冠心病治疗、肿瘤研究、创伤愈合等方面具有广阔的应用前景[2-4]。鉴于EPCs潜在的临床应用价值,有望通过移植EPCs治愈或改善某些疾病,提高病患的生活质量或生存率,但移植细胞的活体示踪及进一步的疗效观察一直是面临的难题。分子影像学是目前可以在活体状态下通过细胞和分子水平对生物学过程进行定性和定量研究的唯一手段,在移植细胞的功能研究中发挥独特的作用。移植磁性对比剂标记的细胞具有替代病变细胞而达到治疗目的的潜力,同时可解决移植细胞在活体内示踪的难题。因此,将需要移植的细胞采用磁性对比剂标记,通过磁共振成像(magnetic resonance imaging,MRI)技术对其进行可视化追踪,以获得移植细胞在体内的变化信息。

本室前期工作已成功分离、培养和鉴定EPCs[5]。本研究采用临床上常用的顺磁性Gd类对比剂Gd-BOPTA标记EPCs,比较不同标记浓度和时间EPCs生物学活性的变化及体外磁共振成像的特点,为将来移植标记EPCs在体实验研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人脐带血取自于第三军医大学妇产科正常顺产或剖腹产产妇(均知情同意)。

### 1.2 主要试剂

EGM-2MV培养基(Combrex公司),胎牛血清(HyClone公司),Histopaque-1077分离液(Sigma公司),0.25%胰蛋白酶(HyClone公司),DPBS(HyClone公司),VEGF(Sigma公司),人纤维连接蛋白(human fibronectin, HFN)(Roche公司),DiI-acLDL(Molecular Probe公司),FITC-UEA-1(Sigma公司),台盼蓝(Sigma公司),Gd-BOPTA(Bracco公司惠赠),jetPEI™-FluoF(Polyplus公司),MTT(Sigma公司),二甲基亚砜(成都市联合化工试剂研所)。

### 1.3 主要仪器

二氧化碳培养箱(Hearus公司),倒置荧光显微镜(Lecia公司),激光共聚焦显微镜(Lecia公司),透射电镜(日立公司),1.5T磁共振扫描仪(GE公司),低速水平离心机(上海仪器二厂),超净工作台(苏州净化设备厂),水平摇床(北京市八一仪器厂),酶联免疫检测仪(Bio-Bad公司),改良的Boyden Chamber小室(江苏海门麒麟医用仪器)。

### 1.4 方法

1.4.1 Gd-BOPTA标记内皮祖细胞 Gd-BOPTA以jetPEI™-FluoF为介质标记EPCs,首先配制10、25、50、75 μg/ml和100 μg/ml 5个浓度,介质与Gd-BOPTA混合比例为1∶0.03,室温下振荡混匀,1 h后将复合物加入细胞培养基中,使Gd-BOPTA的终浓度为5、12.5、25、37.5 μg/ml和50 μg/ml,相应jetPEI™-FluoF的终浓度为0.15、0.375、0.75、1.125 μg/ml和1.5 μg/ml,复合物与细胞的共孵育时间分别为24、48、72 h。

1.4.2 细胞内Gd鉴定 经复合物孵育过夜(12~24 h),弃去孔中培养基,用DPBS洗涤2次,分别行荧光显微镜和透射电镜观察。①荧光显微镜:4%多聚甲醛固定孔中细胞15 min,蒸馏水洗涤2次,倒置荧光显微镜下观察。②透射电镜:用0.25%含EDTA的胰酶消化上述孔中的细胞,收集消化液于离心管中,以1 500 r/min离心10 min,弃上清,向细胞内加入新鲜配制的固定液(0.1 mol/L PBS+4 ℃ 1%戊二醛)固定4 h,1 000 r/min再离心5 min,弃去固定液,1%锇酸固定1 h,梯度丙酮脱水,环氧树脂Epon812包埋,常规超薄切片,醋酸双氧铀及枸橼酸铅双染色,日立JEM-1200EX透射电镜下观察。

1.4.3 Gd-BOPTA标记的EPCs生物学活性检测

1.4.3.1 Gd-BOPTA标记的EPCs增殖能力实验 消化收集贴壁细胞,接种于96孔中,每孔$10^3$~$10^4$细胞,设1孔不加细胞只加培养液作为空白对照孔,比色时以空白孔调零;培养板放入培养箱24 h后,分别加入不同浓度的复合物标记EPCs,每组设5个复孔,余孔不加标记复合物;标记24、48、72 h后,弃孔内含标记物的培养上清液,DPBS冲洗后,每孔加入20 μl MTT溶液(5 mg/ml),孵育4~6 h,弃上清,每孔加入150 μl二甲基亚砜(DMSO),振荡5 min,使结晶物充分溶解;选择490 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度值[$D$(490)],记录结果,观察培养细胞对不同标记物在不同浓度和标记时间条件下的反应性。检测以时间(T)为横轴,光密度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.4.3.2 Gd-BOPTA标记的EPCs黏附能力实验 弃去板中的复合物培养液,PBS冲洗2遍,加入0.25%含EDTA的胰蛋

白酶,作用5 min后加含血清培养基终止胰酶的作用;用吸管吸取孔中培养液,细胞脱离瓶壁后形成细胞悬液;收集细胞悬液于离心管中,以1 000 r/min离心5 min,弃上清,加培养基计数,调节细胞浓度使每管中浓度为$1\times10^5$/ml,共5管,每管1 ml;取1 ml细胞悬液均匀接种于包被纤维连接蛋白的24孔培养板上,37 ℃培养。分别于30 min、1、2、4、6、12、24 h,倒置显微镜下观察细胞黏附能力,并随机选择3个显微镜视野(×400)计算24 h时贴壁细胞数。

1.4.3.3 Gd-BOPTA标记的EPCs迁移能力实验 消化并收集复合物标记24、48、72 h后的贴壁细胞,并计数细胞;将25 μl EGM培养液和VEGF(50 μg/ml)加入改良的Boyden Chamber的下室,盖上滤膜(滤膜光泽的一面朝下),再盖上趋化小室的上室;将含$2\times10^4$标记EPCs的50 μl培养液注入上室,盖以载玻片,覆盖全部孔;将其放入37 ℃、5% $CO_2$培养箱中培养24 h;刮去滤膜上面的未移动细胞,用4%多聚甲醛固定滤膜5 min,行Giemsa染色20 min,用蒸馏水冲洗,干后镜检,随机选择3个显微镜视野(×400)计数迁移到低层的细胞数。

1.4.4 Gd-BOPTA标记内皮祖细胞的体外MR成像 标记24 h后,DPBS洗涤3次,0.25%含EDTA的胰蛋白酶消化细胞后,收集于离心管内,以1 500 r/min离心10 min获得细胞团,用DPBS重悬细胞,调节悬液浓度为$1.0\times10^6$/ml,将细胞悬液移至1.5 ml Ependoff管内,共有5管;另取未标记细胞消化、重悬,制成$1.0\times10^6$/ml细胞悬液,将细胞悬液移至1.5 ml Ependoff管内,共1管,作为对照。

采用1.5T磁共振扫描仪(GE公司,Signa HDX机型),表面线圈,视野(FOV)15 cm×15 cm,激励次数2~3次,层厚2 mm,矩阵256×256,感兴趣区(ROI)取10 $mm^2$。成像序列:①SE序列:$T_1$WI TR 160 ms,TE 7.9 ms;②快速自旋回波序列(FSE):$T_2$WI TR 1 700 ms,TE 84.3 ms;③梯度回波(GRE)序列:$T_2$*WI TR 600 ms,TE 20 ms,反转角20°。计算各序列信号强度变化百分率,用△SI表示。$\triangle SI=(SI_G-SI_0)/SI_0\times100\%$。$SI_G$指各组中不同浓度Gd-BOPTA管信号强度,$SI_0$指各组中对照管未标记细胞的信号强度。

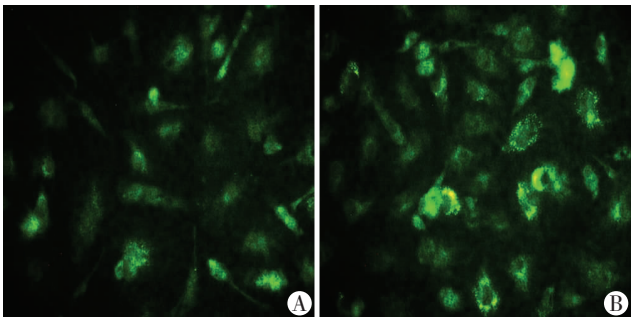
### 1.5 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,标记后细胞黏附、迁移能力和细胞光密度数据采用重复测量的方差分析,组间两两比较采用SNK法;对相同加权不同序列之间的信号强度采用配对资料的wilcoxon符号秩和检验,对相同浓度不同序列间采用方差分析,其中两两比较用SNK-$q$检验。

## 2 结果

### 2.1 Gd-BOPTA标记EPCs的体外观察

2.1.1 倒置荧光显微镜观察 不同浓度的Gd-BOPTA-jetPEI™-FluoF复合物标记的EPCs与未标记细胞相比较,两者之间细胞形态无明显差异,各组间主要差别表现为Gd-BOPTA-jetPEI™-FluoF复合物标记的EPCs胞质内可见绿色荧光强度不同,浓度越高荧光强度越强(图1)。




A:12.5 μg/ml;B:25 μg/ml

**图1 Gd-BOPTA标记的EPCs形态荧光显微镜观察** (×400)

2.1.2 透射电镜观察 未标记的细胞主要表现为细胞核较大,呈椭圆形,含1个核仁,核质比较大,胞质内细胞器稀少(图2A)。大部分Gd-BOPTA-jetPEI™-FluoF标记的EPCs其大小、形态和细胞器无明显变化,胞质内散在分布许多Gd颗粒,颗粒主要位于胞质的胞器如高尔基体周围以及附着在细胞膜上(图2B、C)。

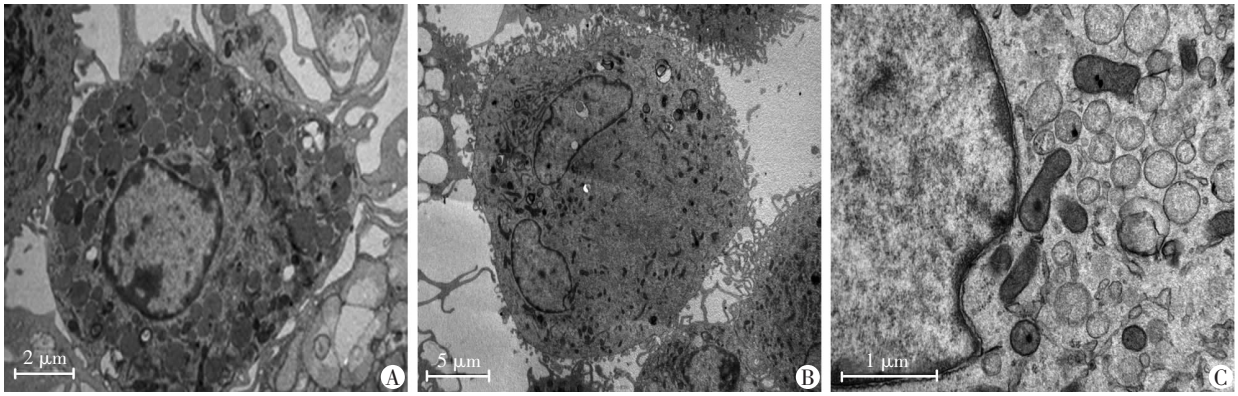
### 2.2 不同标记时间和标记浓度对Gd-BOPTA标记EPCs的标记率影响

在Gd-BOPTA标记12 h后,倒置荧光显微镜下观察标记的EPCs均有绿色荧光颗粒,胞质内的绿色荧光颗粒量与标记浓度有一定的关系。25 μg/ml标记率达到80%,而5 μg/ml标记率仅为40%;标记24 h,25 μg/ml标记率可达90%,而5 μg/ml标记率为57%,50 μg/ml标记率则为70%。可见其标记率呈"抛物线"样分布,在25 μg/ml标记率达峰值,而后浓度增加标记率降低。不同标记浓度和标记时间EPCs标记率见表1。

**表1 不同标记时间和标记浓度Gd-BOPTA标记EPCs的标记率(%,$\bar{x}\pm s$)**

| 时间 | $n$ | 5 μg/ml | 12.5 μg/ml | 25 μg/ml | 37.5 μg/ml | 50 μg/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 12 h | 5 | 41.7±1.0[a] | 55.7±0.8[a] | 80.8±0.5 | 71.6±0.6[a] | 65.1±0.6[a] |
| 24 h | 5 | 56.1±3.6[a] | 67.4±1.7[a] | 88.2±1.6[b] | 73.2±2.2[a] | 70.1±1.1[a] |

a:$P<0.01$,与25 μg/ml浓度比较;b:$P<0.05$,与12 h对应浓度比较

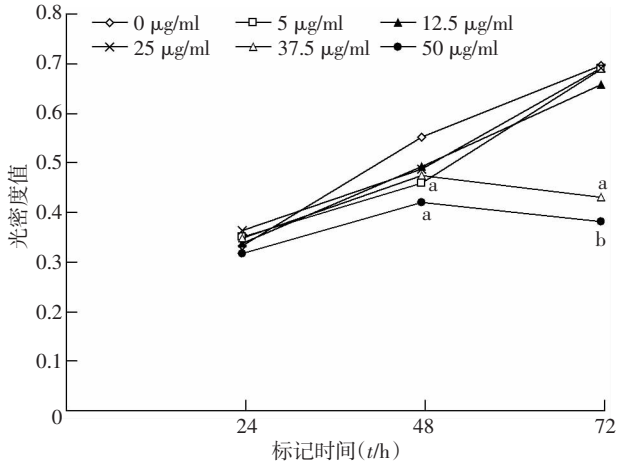



A:未标记的EPCs;B、C:Gd-BOPTA标记EPCs

**图2 透射电镜观察Gd-BOPTA标记前后EPCs的超微形态**

### 2.3 Gd-BOPTA标记的EPCs生物学活性检测结果

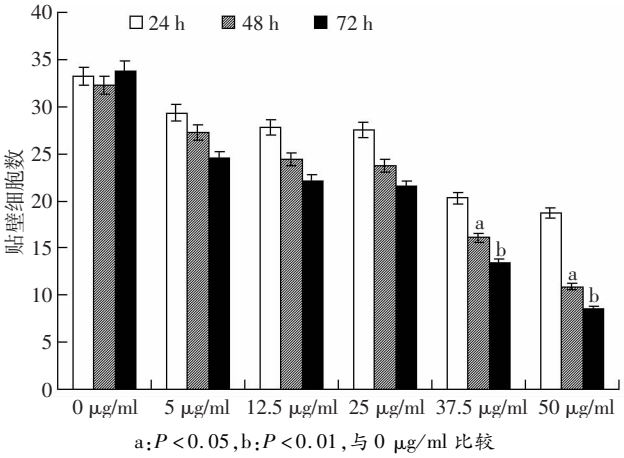
2.3.1 不同标记时间和浓度对Gd-BOPTA标记EPCs的增殖能力影响 在Gd-BOPTA低于25 μg/ml时,浓度和时间对EPCs的增殖能力无明显抑制($P>0.05$),但在Gd-BOPTA高于25 μg/ml时,EPCs的增殖均受抑,且随浓度升高和标记时间延长EPCs增殖受抑越明显,在浓度为50 μg/ml标记72 h时最为显著($P<0.01$),见图3。




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与0 μg/ml比较

**图3 不同浓度和标记时间Gd-BOPTA对EPCs增殖能力的影响**

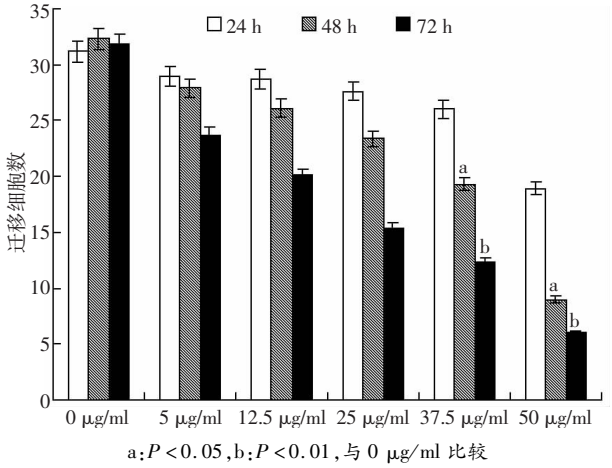
2.3.2 不同标记时间和浓度对Gd-BOPTA标记EPCs的黏附能力影响 在Gd-BOPTA浓度低于25 μg/ml时,浓度和时间对EPCs的黏附能力无明显影响($P>0.05$);但在Gd-BOPTA浓度高于25 μg/ml时,浓度和时间对黏附能力均有影响,贴壁细胞数减少,特别是在50 μg/ml时,贴壁细胞数显著减少,并且贴壁细胞数随着标记时间的延长而减少,在72 h时达到最大效应($P<0.01$),见图4。




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与0 μg/ml比较

**图4 不同浓度和标记时间Gd-BOPTA对EPCs黏附能力的影响**

2.3.3 不同标记时间和浓度对Gd-BOPTA标记EPCs迁移能力的影响 在Gd-BOPTA浓度低于25 μg/ml时,浓度和时间对EPCs的迁移能力无明显影响($P>0.05$);但在Gd-BOPTA浓度高于25 μg/ml,浓度和时间对迁移能力均有影响,迁移细胞数减少,特别是在50 μg/ml时,迁移细胞数显著减少,并且发生迁移的细胞数随着标记时间的延长而减少,在72 h时达到最大效应($P<0.01$),见图5。




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与0 μg/ml比较

**图5 不同浓度和标记时间Gd-BOPTA对EPCs迁移能力的影响**

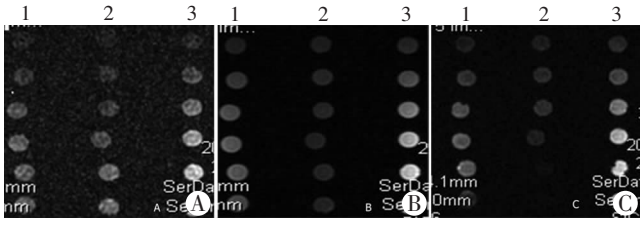
### 2.4 体外磁共振成像

各浓度管信号强度见表2。在$T_1$WI:Gd-BOPTA组相对信号强度随浓度增加信号增加迅速,最大的相对信号强度出现在浓度为25 μg/ml时,而后信号降低,与对照管相比差异明显($P<0.05$,图6A)。在$T_2$WI和$T_2$*WI:Gd-BOPTA组相对信号强度变化趋势与$T_1$WI相比不明显($P>0.05$,图6B、C)。

**表2 不同浓度Gd-BOPTA标记EPCs后在不同序列的MR信号强度($\bar{x}\pm s$)**

| 序列 | 0 | 5 | 12.5 | 25 | 37.5 | 50 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $T_1$WI | 57.8±5.4 | 84.7±4.5[a] | 137.1±18.1[a] | 151.0±11.1[a] | 146.0±6.6[a] | 114.1±13.5[a] |
| $T_2$WI | 202.1±12.2 | 205.7±15.6 | 216.5±24.8 | 239.3±31.2 | 212.1±18.4 | 186.9±11.4 |
| $T_2$*WI | 199.6±10.7 | 200.5±17.5 | 143.0±23.6 | 241.9±33.1 | 209.5±20.0 | 176.9±10.5 |

a:$P<0.05$,与0 μg/ml比较




A:$T_1$WI序列;B:$T_2$WI序列;C:$T_2$*WI序列;1:FE-EPCs;2:P7228-EPCs;3:Gd-BOPTA-EPCs;自上而下浓度依次为0、5、12.5、25、37.5、50 μg/ml

**图6 不同浓度标记后EPCs在MR不同序列上的信号强度**

## 3 讨论

随着分子影像学(molecular imaging)的发展,活体移植细胞MRI示踪技术逐渐得到应用[6]。目前,已有大量的动物实验表明,移植干细胞在神经系统损伤和中枢神经系统退行性病变、心肌梗死、血液病等方面的治疗取得了可喜的成果。随着对内皮祖细胞的深入研究,通过移植内皮祖细胞可以改善肢体缺血情况在动物模型已得到证实[7]。但是,内皮祖细胞广泛应用于临床尚需解决许多问题,其中关键的是如何监测移植细胞在体内的存活、迁移及分化情况。研究表明,应用特异性对比剂标记供体移植细胞和受体MRI检测是活体观察移

植细胞存活和分布的具有应用潜力的方法[2-3,8-10]。

大量的实验研究致力于开发一种标记效率高且MR成像效果较佳的新型探针,但是这些新型探针结构越来越复杂,对大多数实验人员来说并不易获得,而且尚未通过临床试验。本研究采用的Gd-BOPTA已通过美国FDA认证,且是临床上较为常用的磁共振对比剂。Gadobenate dimeglumine(Gd-BOPTA)是顺磁性物质钆Gd(Ⅲ)离子的大分子螯合物,为阳性对比剂。其主要产生$T_1$正性对比效应,对$T_2$加权影响小。为Gd-DTPA的衍生物,在DTPA骨架上加入苯氧基而制成,易于被有机阴离子输送至细胞内,其主要的生化特性与非特异性细胞外间隙对比剂(如Gd-DTPA)相似,但是代谢途径和弛豫率又有所不同,在含有生物大分子(如小牛血清蛋白)的溶液中,$T_1$弛豫率约为Gd-DTPA的2倍,这主要是因为Gd-BOPTA与前述生物大分子作用降低了Gadobenate分子的共振频率,因此增加了弛豫率。动物体内实验表明,较低剂量的Gd-BOPTA即可明显增加弛豫率,并可达理想的强化效果。

用于标记的顺磁性Gd在自然状态下并不能被哺乳动物细胞摄取,因此要达到磁性标记的目的,必须通过载体,且其在体外显微镜下不能得到直观的结果,需结合荧光物质提供显影[11]。本研究采用jetPEI™-FluoF作为Gd-BOPTA标记细胞的介质,jetPEI™-FluoF是一种荧光转染试剂,也属于阳离子聚合物,能够转染DNA,转染效率高于其他阳离子脂质体和聚合物,对细胞毒副作用小,且耐血清,操作简单易行,以此作为标记介质,可同时提供MR和荧光显影。

值得一提的是荧光显微镜和透射电镜结果表明,标记率在浓度为25 μg/ml标记24 h时最高,当浓度高于25 μg/ml标记24 h时标记率降低,我们认为是因为Gd离子与Ca离子相似,可竞争结合Ca通道,当达到饱和浓度后细胞对Gd摄取能力降低。

Gd-BOPTA标记EPCs后对细胞的黏附能力、迁移能力及增殖能力检测结果表明,在Gd-BOPTA标记浓度低于25 μg/ml时,标记浓度和时间对细胞的黏附能力、迁移能力及增殖能力均无明显影响;浓度大于25 μg/ml标记48、72 h时,细胞的黏附能力、迁移能力及增殖能力受损。结果表明,Gd-BOPTA标记浓度低于25 μg/ml标记24 h时,对细胞的黏附能力、迁移能力及增殖能力无明显影响。

Daldrup-Link等[12]关于标记造血干细胞的研究结果显示,增加细胞密度有助于提高细胞对标记物的摄取,延长标记时间也可以增加细胞对标记物的摄取,但会降低细胞活性。本实验选择标记24 h后进行磁共振信号检测,是因为此时细胞的标记效率高且对细胞活性影响不大。本实验分别用FSE-$T_1$WI、FSE-$T_2$WI及FIESTA-$T_2$*WI对不同浓度标记24 h后的EPCs及未标记细胞进行MR扫描,Gd-BOPTA作用主要表现在$T_1$WI序列,研究结果表明随着浓度的升高信号先升高后降低,在浓度为25 μg/ml时信号强度最大而后降低,这与Gd-BOPTA对标记EPCs的生物活性影响结果相一致,因Gd可竞争性结合Ca通道,在25 μg/ml的浓度是一转折点,说明当浓度高于此时,进入细胞内的Gd达到饱和,细胞外的Gd不能再随着浓度的增加而进入细胞内,所以信号开始降低。

本研究采用不同浓度的Gd-BOPTA标记EPCs,比较不同标记浓度和标记时间对EPCs生物活性的影响及在不同的扫描序列上信号强度的变化情况,为将来利用MRI技术追踪移植的EPCs,无创性地监测EPCs在活体内的存活和迁移,以及随移植时间而演变的规律奠定基础。

## 参考文献:

[1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al*. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.

[2] Frontczak-Baniewicz M, Gordon-Krajcer W, Walski M. The immature endothelial cell in new vessel formation following surgical injury in rat brain [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2006, 27(4): 539-546.

[3] Bahlmann F H, de-Groot K, Mueller O, *et al*. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin Ⅱ receptor antagonists [J]. Hypertension, 2005, 45(4): 526-529.

[4] Yoder M C, Ingram D A. The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth: is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process? [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796(1): 50-54.

[5] 王博, 王舒楠, 张伟国, 等. 人脐血内皮祖细胞体外扩增、鉴定和生物学活性[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(18): 1744-1748.

[6] Chen J, Jia Z Y, Wang Y Y, *et al*. *In vivo* serial MR imaging evaluates neointimal hyperplasia inhibited by intravenously transfused endothelial progenitor cells in carotid artery injured mice [J]. J Neuroimaging, 2011, 21(1): 49-55.

[7] Fan Y, Shen F, Frenzel T, *et al*. Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice [J]. Ann Neurol, 2010, 67(4): 488-497.

[8] Laing A J, Dillon J P, Condon E T, *et al*. Mobilization of endothelial precursor cells: systemic vascular response to musculoskeletal trauma [J]. J Orthop Res, 2007, 25(1): 44-50.

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

[10] Islam T, Josephson L. Current state and future applications of active targeting in malignancies using superparamagnetic iron oxide nanoparticles [J]. Cancer Biomark, 2009, 5(2): 99-107.

[11] Huber M M, Staubli A B, Kustedjo K, *et al*. Fluorescently detectable magnetic resonance imaging agents [J]. Bioconjug Chem, 1998, 9(2): 242-249.

[12] 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.

(**收稿**:2011-07-17;**修回**:2011-09-20)

(编辑 汪勤俭)