论著

文章编号:1000-5404(2013)04-0284-04

PEI-SPIO 标记对关节软骨细胞生物学特性的影响

林 肖[1],王凤玲[1],陈加荣[1],林兴德[2],杨 柳[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院关节外科[1];266011 山东 青岛,济南军区青岛第一疗养院理体疗科[2])

[摘要] **目的** 研究聚乙烯亚胺(polyethylenimine,PEI)包被的超顺磁性氧化铁粒子(superparamagnetic iron oxid,SPIO)对透明软骨细胞增殖和分泌Ⅱ型胶原蛋白功能的影响,探讨其标记软骨细胞的适宜标记浓度和适宜孵育时间。**方法** 取1~3月龄巴马小香猪后膝关节透明软骨体外培养的第2代细胞,以2、4、6、8、10、12、14 μg/mL浓度的PEI-SPIO标记液标记的软骨细胞为实验组,没有PEI-SPIO标记的软骨细胞作为对照组,分别在37 ℃培养箱中培育6、12、18、24、30 h,通过普鲁士蓝染色、透射电镜、细胞内铁含量、WST-1和半定量RT-PCR法检测,筛选出PEI-SPIO的最佳标记浓度和最佳孵育时间。**结果** 6、8、10、12、14 μg/mL组标记后的普鲁士蓝染色显示90%以上的细胞被铁粒子标记;细胞内铁含量的测定结果显示标记时间超过24 h,各组细胞内铁含量基本不再增加;WST-1检测磁标记的细胞毒性结果显示,对照组与实验组无统计学差异($P>0.05$)。8 μg/mL标记的软骨细胞,其Ⅱ型胶原蛋白RT-PCR条带的灰度值比值与未标记软骨细胞比较有明显降低[(13.04±0.60)% *vs*(18.89±1.26)%,$P<0.05$];6 μg/mL标记的软骨细胞,其条带的灰度值比值与未标记软骨细胞比较无明显差异[(27.32±1.02)% *vs*(28.56±1.15)%,$P>0.05$]。**结论** PEI-SPIO可达到安全有效标记软骨细胞的要求,PEI-SPIO标记液为6 μg/mL,标记24 h是PEI-SPIO标记软骨细胞的适宜标记浓度和标记时间,既可达到标记软骨细胞的目的,又不对软骨细胞的活性、增殖和Ⅱ型胶原蛋白基因的表达造成影响。

[关键词] SPIO;透明软骨细胞;磁标记
[中图法分类号] R318.08;R322.72;R329.28 [文献标志码] A

Biological characteristics of superparamagnetic iron oxid with amphiphilic polyethylenimine-labeled articular chondrocytes

Lin Xiao[1], Wang Fengling[1], Chen Jiarong[1], Lin Xingde[2], Yang Liu[1] ([1]Center for Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Physiotherapy, First Sanatorium of Qingdao, Jinan Military Region, Qingdao, Shandong Province, 266011, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of superparamagnetic iron oxid (SPIO) coated with amphiphilic polyethylenimine (PEI) on the proliferation and type Ⅱ collagen secretion of labeled articular chondrocytes, and to determine the optimal labeling concentration and incubation time of PEI-SPIO. **Methods** Chondrocytes from knee joints of Bama mini-pigs (1-3 months old) were harvested and cultured. Cells in passage two that were labeled with PEI-SPIO at the concentrations of 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 μg/mL were enrolled as experiment groups, and the unlabeled cells served as control. All the cells were incubated in 37 ℃ for 6, 12, 18, 24 and 30 h, respectively. Prussian blue staining, transmission electron microscopy, intracellular iron content test, WST-1 test and semi-quantitative RT-PCR were applied to evaluate the effect of PEI-SPIO on articular chondrocytes for screening the optimal labeling concentration and incubation time. **Results** Prussian blue staining showed that more than 90% of chondrocytes were labeled in 6, 8, 10, 12 and 14 μg/mL of PEI-SPIO. Intracellular iron content increased slowly and became steady after 24 h. There was no statistically significant difference in cell viability and proliferation between the labeled and unlabeled cells ($P>0.05$). Type Ⅱ collagen expression in the 8 μg/mL group was significantly lower than that in the control group [(13.04±0.60)% *vs* (18.89±1.26)%, $P<0.05$], while the difference of type Ⅱ collagen expression was not significant between the 6 μg/mL group and the group [(27.32±1.02)% *vs* (28.56±1.15)%,

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划,2012AA020504);国家自然科学基金重点项目(31130021);国家自然科学基金面上项目(30870639)
[通信作者] 杨 柳,E-mail: jointsurgery@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121211.1308.009.html(2012-12-11)

$P>0.05$]. **Conclusion** PEI-SPIO can effectively and safely label articular chondrocytes. In this study, the optimal labeling concentration and incubation time of PEI-SPIO are determined as 6 μg/mL and 24 h, which do not affect the viability, proliferation and type Ⅱ collagen secretion of articular chondrocytes.

[**Key words**] superparamagnetic iron oxid; hyaline cartilage cells; magnetic marker

Supported by the the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2012AA020504), Key Program of National Natural Science Foundation of China (31130021), and the General Program of National Natural Science Foundation of China (30870639). Corresponding author: Yang Lin, E-mail: jointsurgery@163.com

关节软骨损伤的治疗一直是运动损伤领域的重要课题,目前的多种治疗方法都有各自的局限性,效果不理想[1-3]。1994年始出现了组织工程技术应用于软骨损伤的修复的报道[4],为治疗软骨损伤提供了新的技术。软骨细胞能合成分泌特异性的细胞外基质,同时能接受多种细胞因子的调控[5],是目前组织工程临床治疗中应用最广泛的种子细胞。但移植的种子细胞在软骨缺损区的分布、迁移、转归过程一直都是研究的难点,无法有效地识别和追踪监测。超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxid,SPIO)是公认的磁共振造影剂,有望解决组织工程种子细胞的示踪监测问题。本实验拟通过体外研究聚乙烯亚胺(polyethylenimine,PEI)包被的SPIO(PEI-SPIO)不同的标记浓度和不同孵育时间对软骨细胞活性、增殖以及Ⅱ型胶原蛋白基因的表达能力的影响,确定PEI-SPIO标记软骨细胞的最佳浓度和最佳孵育时间,为研究PEI-SPIO在活体示踪软骨细胞修复关节软骨缺损中的迁移、分化、转归过程提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料及动物

PEI-SPIO由合作单位国家生物医学材料研究中心提供,DMEM培养基(低糖型)、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶均为Gibco产品。CO_2培养箱(Sheldo公司,美国),倒置荧光相差显微镜、偏振光显微镜(OLYMPUS公司 日本),微量元素检测仪由西南医院检验科提供,反转录试剂盒(Toyobo公司),3月龄贵州巴马小香猪(第三军医大学实验动物中心提供)。

1.2 透明软骨细胞的分离、培养及鉴定

取3月龄贵州巴马小香猪后膝关节软骨,加0.25%胰蛋白酶消化2 h,用等量培养液(含10%胎牛血清的DMEM)终止消化,PBS缓冲液冲洗2遍,加入0.2%的Ⅱ型胶原酶消化12 h,用等量的培养液终止消化,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用培养液重悬,以$1\times10^5/cm^2$的细胞数接种于250 mL玻璃培养瓶,置入5% CO_2、37 ℃培养箱中培养,视细胞贴壁情况1~2 d首次换液,以后每隔3~4 d换液1次,以倒置相差显微镜动态观察细胞,待细胞生长融合铺满瓶底80%时,加入0.25%胰蛋白酶消化,按1∶2传代后继续培养,同时取部分细胞制成爬片,贴壁生长约80%,4%多聚甲醛固定后,用甲苯胺蓝、天狼猩红将爬片染色,Ⅱ型胶原免疫组化染色。

1.3 磁标记的方法及鉴定

取17.4 mg/mL的PEI-SPIO原液加入完全培养液中分别稀释为2、4、6、8、10、12、14 μg/mL的标记液备用。取第2代透明软骨细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用含10% 胎牛血清的DMEM培养基重悬,制成单细胞悬液,稀释至5×10^4/mL后,铺板爬片[6],待细胞长至孔板85%面积时,弃去原培养液,PBS冲洗2遍,取等量PEI-SPIO标记液予以等量换液。置于37 ℃,5% CO_2培养箱中孵育24 h后,弃去原含PEI-SPIO血清的培养液,PBS冲洗2次,再用含肝素10 U/mL的PBS冲去多余的细胞外游离的铁粒子,4%多聚甲醛固定,2% $K_3Fe(CN)_6$ + 6% HCl的Perl反应液孵育30 min,PBS冲洗1次,核固红复染1~2 min。细胞质内见蓝色颗粒为普鲁士蓝染色阳性,100倍显微镜下10个视野计数阳性细胞,测定各组细胞的标记阳性率:细胞染色阳性数/细胞总数×100%。透射电镜下观察铁粒子在细胞内的分布。

1.4 细胞内铁含量的测定

取第2代透明软骨细胞,稀释成1×10^6/mL接种于24孔板中2 d,弃去培养液,取1.3中配制好的标记液标记,分7个浓度分别标记,置于37 ℃,5% CO_2培养箱中孵育6、12、18、24、30 h后,倒掉标记液,用含肝素10 U/mL的PBS冲去多余的细胞外游离的铁粒子,加入0.25%胰蛋白酶消化5 min,完全培养液终止消化,吸管吹打,吸取细胞悬液置于EP管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入细胞裂解液24 h,用微量元素分析仪检测各个EP管中铁含量。

1.5 水溶性四氮唑法(WST-1)检测磁标记的细胞毒性

将透明软骨细胞用培养液调整细胞数至1×10^4/mL,取200 μL均匀分散的细胞接种于96孔板中,贴壁1 d后,取1.3中配置好的标记液,7种浓度的标记液分别标记(实验组),每板8组,每组5个复孔,1组相同浓度的未标记透明软骨细胞作为对照组,于24 h取出测光密度值[$D(490)$]。弃培养液,每孔加入20 μL WST-1液,振荡5~10 min,充分溶解细胞代谢产物,测定各孔$D(490)$。

1.6 磁标记对软骨细胞功能的影响

取3组细胞,1组为对照组,另2组为实验组,分别用6、8 μg/mL的标记液标记24 h,消化离心后,用Trizol法分别提取总RNA,后按照Toyobo公司反转录试剂盒的说明操作,反转录得到cDNA,设计引物,上游引物5′-CACCCAGAGTGGAAGAGCG-3′,下游引物5′-TCAGTGCACAGTAGACGGAGGA-3′,引物长度19 bp。以反转录得到的cDNA为模板建立PCR反应体系进行PCR的扩增,将扩增后的产物在3%琼脂糖凝胶中电泳,对测得的目的条带的灰度值和内参条带的灰度值的比

值进行分析统计。

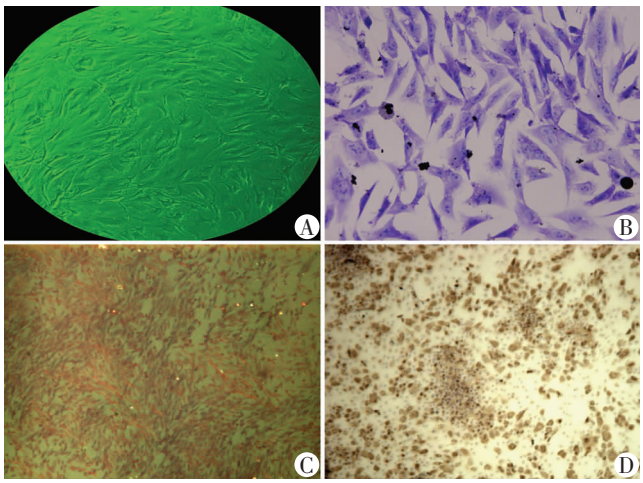
1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 16.0 统计软件，实验组与对照组间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 透明软骨细胞的鉴定

倒置相差显微镜下观察，原代透明软骨细胞 1～2 d 贴壁，呈圆形或椭圆形，2～3 d 换液，1 周后细胞生长融合成细胞集落，增殖旺盛，细胞呈长椭圆形（图 1A），取对数生长期的第 2 代细胞进行检测，甲苯胺蓝将软骨细胞均质蓝染，细胞外基质染呈蓝紫色（图 1B），在偏振光显微镜下观察天狼猩红染色，Ⅱ型胶原纤维排列紧密，显示双折光性，呈红黄色的粗大纤维（图 1C），Ⅱ型胶原免疫组化结果显示：大部分细胞呈阳性染色，呈褐色，少量细胞染色呈阴性（图 1D）。



A：分离猪膝关节软骨细胞培养 1 周（×100）；B：甲苯胺蓝染色（×200）；C：天狼猩红染色（偏振光显微镜 ×100）；D：Ⅱ型胶原免疫组织化学鉴定（×100）

图 1 透明软骨细胞的鉴定

2.2 磁标记的鉴定

对标记后的细胞进行普鲁士蓝染色，结果显示，大部分细胞都被蓝染，提示磁标记阳性率高，通过计算标记率，>6 μg/mL 标记浓度的实验组标记 24 h 标记阳性率均达到 90% 以上（图 2）。透射电镜观察结果显示：细胞细胞质内有黑色致密颗粒分布，细胞膜外有少量分布，细胞核内未见黑色致密颗粒，提示 SPIO 主要分布在细胞的细胞质内（图 3）。

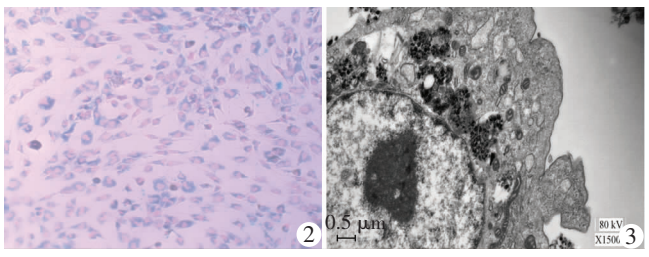


图 2 普鲁士蓝染色鉴定被标记细胞及标记率 （×100）

图 3 透射电镜检查 SPIO 在细胞内的分布情况

2.3 细胞内铁含量的测定

随 SPIO 浓度的增加，细胞内铁含量随之相应增加，2、4 μg/mL 组细胞内铁含量明显低于其余组，浓度超过 6 μg/mL，各组的铁含量差别不大；从标记时间看，细胞内铁含量也随标记时间逐步增加，但标记 24 h 后内铁含量增长曲线趋于平缓，细胞内铁含量增长缓慢，提示超过 24 h 后，SPIO 标记的效率下降，单纯的增加标记时间并不能达到更高的标记效率。

2.4 磁标记的细胞毒性检测

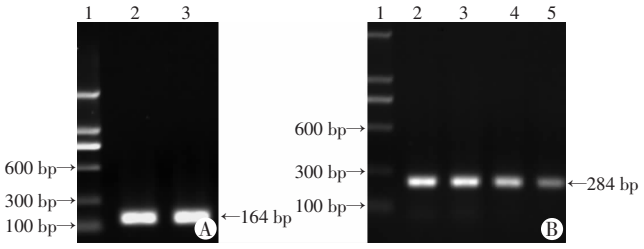
标记 24 h 的 7 个不同浓度的实验组和对照组之间无统计学差异（$P>0.05$，表 1），采用的 7 个标记浓度磁标记 24 h 后细胞的活性没有受到影响。

表 1 WST-1 检测 SPIO 标记液标记 24 h 后对透明软骨细胞活性的影响（$n=5$，$\bar{x} \pm s$）

组别	D(490)
对照组	2.75 ± 0.34
2 μg/mL 实验组	2.41 ± 0.45
4 μg/mL 实验组	2.62 ± 0.35
6 μg/mL 实验组	2.85 ± 0.38
8 μg/mL 实验组	2.80 ± 0.39
10 μg/mL 实验组	3.02 ± 0.45
12 μg/ml 实验组	2.79 ± 0.49
14 μg/ml 实验组	2.23 ± 0.21

2.5 磁标记对软骨细胞的功能影响

Ⅱ型胶原蛋白基因半定量 RT-PCR 电泳结果显示：6 μg/mL 实验组与对照组条带亮度差别不大，8 μg/mL 实验组条带亮度明显比对照组低（图 4），测量灰度值比值后进行统计结果显示：6 μg/mL 实验组（27.32 ± 1.02）% 和对照组（28.56 ± 1.15）% 的灰度值比值无统计学差异（$P>0.05$），而 8 μg/mL 实验组（13.04 ± 0.60）% 与对照组（18.89 ± 1.26）% 比较有统计学差异（$P<0.05$），提示 6 μg/mL 的标记液标记 24 h 后对透明软骨细胞中Ⅱ型胶原蛋白基因的表达无影响，而 8 μg/mL 的标记液标记 24 h 后，抑制了透明软骨细胞中Ⅱ型胶原蛋白基因的表达。



A：β-actin 1：标准；2：对照组；3：6 μg/mL 实验组；B：Ⅱ型胶原蛋白基因 1：标准；2：6 μg/mL 对照组；3：6 μg/mL 实验组；4：8 μg/mL 对照组；5：8 μg/mL 实验组

图 4 RT-PCR 检测Ⅱ型胶原蛋白基因的表达

3 讨论

本研究观察 PEI-SPIO 标记浓度和孵育时间 2 个因素对透明软骨生物学特性的影响，分析如何用 SPIO 安全、有效地标记透明软骨细胞。本实验采用甲苯胺蓝染色、天狼猩红染色及免疫组化的方法对分离培养的第 2 代猪膝关节软骨细胞进行定性分析，证实了用

于实验研究的细胞是具有分泌Ⅱ型胶原能力的透明软骨细胞。SPIO 的标记技术与 MR 显像相结合,用于在活体上示踪移植到体内的 SPIO 标记的细胞的分布、迁移的技术已经趋于成熟[7],实现了细胞的在体识别和可视化追踪,可连续地观察细胞在体内的迁徙、转归过程。目前该技术已广泛应用于脑、肝脏等多种器官疾病的实验研究[8-10]。近年 Kobayashi 等[11]将其应用于监测干细胞修复软骨组织缺损的实验研究。目前应用较成熟的 SPIO 都是由葡聚糖包裹,表面都呈负电荷,而细胞表面也呈负电荷,因此在标记过程中 SPIO 需要先与转染剂混合,使 SPIO 表面由负电荷变为正电荷,才能用于标记细胞,增加标记细胞的效率[12]。而本实验所用的 PEI-SPIO 的包裹材料是 PEI,表面呈正电荷,可以直接用于细胞的标记,提高了标记效率。另外 PEI 作为骨架的包被材料在体内的降解时间要长于葡聚糖[13],因此能否以此断定 PEI-SPIO 在体内示踪的时间长于葡聚糖包裹的 SPIO,需要进行进一步证实。SPIO 标记细胞成功的标准是在不影响细胞活性的前提下让细胞内的 SPIO 含量达到 MRI 成像要求的量。本实验通过 WST-1 检测,证实了 2、4、6、8、10、12、14 μg/mL SPIO 标记液对透明软骨细胞的增殖没有影响,还通过半定量 RT-PCR 的检测,探讨了 SPIO 对于透明软骨细胞中Ⅱ型胶原蛋白基因的影响,结果显示浓度 >8 μg/mL 会影响透明软骨细胞Ⅱ型胶原蛋白基因的表达。

本实验之所以采用从幼猪关节分离培养的第 2 代透明软骨细胞,是因为体外培养的软骨细胞多代后会分化为成纤维细胞,失去软骨细胞合成Ⅱ型胶原的能力,幼猪关节软骨细胞具有高有丝分裂率、较强的分裂能力和良好的软骨细胞特性,降低其分化成纤维细胞的数量[14]。本实验在预实验的基础上挑选了 7 个不同的标记浓度和 5 个不同的标记时间来研究 PEI-SPIO 标记透明软骨细胞的方法,普鲁士蓝染色和透射电镜证明了该材料可以高效地标记软骨细胞,铁粒子主要分布于软骨细胞的细胞质;WST-1 检测证明了其安全性,实验组的标记浓度对细胞生长增殖没有影响;细胞内铁含量的曲线显示:标记时间 30 h 与 24 h 相比,细胞内铁含量变化不大,增加标记时间不能有效增加细胞内铁含量,选择 24 h 作为标记时间,可以达到磁标记的要求;但是通过Ⅱ型胶原蛋白半定量 RT-PCR 检测发现 6 μg/mL 对Ⅱ型胶原蛋白基因的表达无影响,8 μg/mL 会降低透明软骨细胞Ⅱ型胶原蛋白基因的表达,说明浓度 >8 μg/mL 时软骨细胞的增殖不受影响,而Ⅱ型胶原蛋白基因的表达受到抑制,对于透明软骨细胞来讲,<8 μg/mL 的标记浓度才是安全可靠的。

综上所述,浓度为 6 μg/mL 的 PEI-SPIO 可以达到安全、有效标记透明软骨细胞的要求,标记 24 h 是 PEI-SPIO 标记透明软骨细胞的适宜标记时间,既可达到标记软骨细胞的目的,又不对软骨细胞的活性、增殖和Ⅱ型胶原蛋白基因的表达造成影响。

参考文献:

[1] Gobbi A, Nunag P, Malinowski K. Treatment of full thickness chondral lesions of the knee with microfracture in a group of athletes[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2005, 13(3): 213-221.

[2] Kreuz P C, Steinwachs M R, Erggelet C, *et al*. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(11): 1119-1125.

[3] McCormick F, Yanke A, Provencher M T, *et al*. Minced articular cartilage--basic science, surgical technique, and clinical application[J]. Sports Med Arthrosc, 2008, 16(4): 217-220.

[4] Kessler M W, Ackerman G, Dines J S, *et al*. Emerging technologies and fourth generation issues in cartilage repair[J]. Sports Med Arthrosc, 2008, 16(4): 246-254.

[5] Mak K K, Chen M H, Day T F, *et al*. Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with lhh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation[J]. Development, 2006, 133(18): 3695-3707.

[6] 陈加荣, 杨柳, 戴刚, 等. SPIO、GFP 双重标记猪骨髓间充质干细胞的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(21): 2313-2315.

[7] Rogers W J, Meyer C H, Kramer C M. Technology insight: *in vivo* cell tracking by use of MRI[J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006, 3(10): 554-562.

[8] Heyn C, Ronald J A, Ramadan S S, *et al*. *In vivo* MRI of cancer cell fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain[J]. Magn Reson Med, 2006, 56(5): 1001-1010.

[9] Koyama T, Shimura M, Minemoto Y, *et al*. Evaluation of selective tumor detection by clinical magnetic resonance imaging using antibody-conjugated superparamagnetic iron oxide[J]. J Control Release, 2012, 159(3): 413-418.

[10] Kakite S, Fujii S, Nakamatsu S, *et al*. Usefulness of administration of SPIO prior to RF ablation for evaluation of the therapeutic effect: an experimental study using miniature pigs[J]. Eur J Radiol, 2011, 78(2): 282-286.

[11] Kobayashi T, Ochi M, Yanada S, *et al*. A Novel cell delivery system using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external magnetic device for clinical cartilage repair[J]. Arthroscopy, 2008, 24(1): 69-76.

[12] Van-Buul G M, Farrell E, Kops N, *et al*. Ferumoxides-protamine sulfate is more effective than ferucarbotran for cell labeling: implications for clinically applicable cell tracking using MRI[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2009, 4(5): 230-236.

[13] Liu G, Yang H, Zhang X M, *et al*. MR imaging for the longevity of mesenchymal stem cells labeled with poly-L-lysine-Resovist complexes[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2010, 5(2): 53-58.

[14] 闫辉, 于长隆. 不同细胞移植修复兔全层关节软骨缺损的比较研究[J]. 中国运动医学杂志, 2003, 22(3): 234-239.

(**收稿**:2012-09-18;**修回**:2012-10-21)

(编辑 龙 亮)