文章编号:1000-5404(2014)15-1567-05

论著

兔脂肪间充质干细胞的培养鉴定及体外磁标记MR成像

谢光友,杨海涛,吕富荣,鲁文力,盛 波,肖智博,吕发金,欧阳羽 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院放射科)

[摘要] **目的** 研究兔脂肪间充质干细胞(adipose derived stem cells,ADSCs)的培养鉴定方法,联合应用超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide particles,SPIO)和多聚赖氨酸(poly-l-lysine,PLL)行体外磁标记细胞,探讨磁标记示踪的可行性。**方法** 分离、纯化并培养兔ADSCs,流式细胞术鉴定细胞表面抗原CD90、CD44和CD34。应用SPIO-PLL标记细胞,普鲁士蓝染色和透射电镜检测胞内铁粒子。体外3.0T MR分别对1×10^7个未标记ADSCs(空白对照),经25、50、75 μg/mL SPIO-PLL分别标记的1×10^7个细胞,经25 μg/mL SPIO-PLL标记的1×10^7个(标记1 d)、1×10^7个(标记3 d)和5×10^6个(标记1 d)ADSCs进行成像,包括T_1WI、T_2WI及T_2^*WI序列,测量各组的信号强度和弛豫时间。**结果** 第3代ADSCs纯度高、排列规则,细胞呈漩涡状,流式细胞术检测结果示CD44和CD90阳性表达率分别为99.2%、98.7%,CD34表达阴性。普鲁士蓝染色和透射电镜示胞浆内蓝色颗粒,磁标记率近100%。MR示随着SPIO-PLL浓度增高,T_2^*WI和T_2WI序列的信号强度变化较T_1WI明显。1×10^7个ADSCs(标记1 d)的信号强度变化率较1×10^7个(标记3 d)和5×10^6个(标记1 d)大,T_2^*和T_2弛豫时间与T_1弛豫时间相比差异均有统计学意义($F=161.47$,$P<0.05$),但T_2^*和T_2弛豫时间相比差异无统计学意义($F=5.88$,$P>0.05$)。**结论** 通过分离纯化培养可获得足量的ADSCs,SPIO-PLL能够有效标记ADSCs,体外可行MR细胞成像,以T_2^*WI和T_2WI序列敏感。

[关键词] 脂肪间充质干细胞;超顺磁性氧化铁;磁标记;磁共振成像;体外
[中图法分类号] R329.2; R392-33; R445.2 [文献标志码] A

Culture and identification of rabbit adipose-derived stem cells and its magnetic resonance imaging *in vitro*

Xie Guangyou, Yang Haitao, Lyu Furong, Lu Wenli, Sheng Bo, Xiao Zhibo, Lyu Fajin, Ouyang Yu (Department of Radiology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate how to culture and identify rabbit adipose-derived stem cells (ADSCs), and to explore the feasibility of tracing ADSCs after being labeled by superparamagnetic iron oxide particles (SPIO) combined with poly-l-lysine (PLL) *in vitro*. **Methods** ADSCs were isolated from New Zealand rabbit, and then purified and primarily cultured. Flow cytometry (FCM) was used to identify cell surface antigens CD44, CD90 and CD34. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the intracellular iron particles in SPIO-PLL labeled ADSCs after Prussian blue staining. 3.0-T MR scanning *in vitro* system was used to scan 1×10^7 ADSCs unlabeled and labeled with 25, 50 and 75 μg/mL SPIO-PLL respectively, or labeled with 25 μg/mL for 1 or 3 d, or to scan 5×10^6 cells labeled with 25 μg/mL for 1 d. T_1WI, T_2WI and T_2^*WI arrays were performed for the signal intensity (SI) and relaxation time of each tube. **Results** The ADSCs of third generation were of high purity, in regular arrangement presenting whirlpool-like. The cells had an expression rate of 98.7% for CD44 and 99.2% for CD90, but negative expression for CD34. TEM showed that iron particles existed in the cytoplasm of ADSCs after Prussian blue staining, and the rate of labeling was nearly 100%. T_2^*WI and T_2WI demonstrated a more obvious decrease in SI than that of T_1WI with the increasing concentration of SPIO-PLL. The percentage of SI in 1×10^7 ADSCs (labeled for 1 d) was significantly higher than that of 1×10^7 (labeled for 3 d) and 5×10^6 (labeled for 1 d). The relaxation time of

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2011jjA10082)
[通信作者] 杨海涛,E-mail:frankyang119@126.com
吕富荣,E-mail:lfr918@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140225.0924.008.html(2014-02-25)

T_2^* and T_2 compared with T_1 was significant different ($F=161.47$, $P<0.05$), but the relaxation time between T_2^* and T_2 was not statistically significant ($F=5.88$, $P>0.05$). **Conclusion** Sufficient ADSCs are obtained through isolation, purification and culture. ADSCs are labeled effectively by SPIO-PLL and detected through MR scanning *in vitro*, with T_2^*WI and T_2WI arrays more sensitive.

[**Key words**] adipose derived stem cells; superparamagnetic iron oxide particles; magnetically labeled; magnetic resonance; *in vitro*

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjA10082). Corresponding author: Yang Haitao, E-mail: frankyang119@126.com, Lyu Furong, E-mail: lfr918@sina.com

由椎间盘退变引起的下腰背疼痛是常见的慢性病,目前临床治疗不能从根本上解决病因。椎间盘缺乏神经血管,自身无再生修复能力[1]。随着细胞分子生物学、基因学及材料工程学的迅速发展,运用干细胞组织工程技术延缓或逆转退变椎间盘成为可能。脂肪间充质干细胞(adipose derived stem cells,ADSCs)含量丰富,来源广,取材安全,可诱导分化为骨、软骨、脂肪细胞等,是一种重要的种子细胞[2]。磁共振成像(magnetic resonance imaging,MRI)具有成像时间、空间及组织分辨率高等优点,为磁标记干细胞移植并行活体示踪其迁移、增殖分化及转归提供理想的技术。本研究主要从兔脂肪组织中分离、纯化培养并鉴定 ADSCs;用超顺磁性氧化铁纳米粒子(superparamagnetic iron oxide particles,SPIO)和多聚左旋赖氨酸(poly-L-lysine,PLL)制成的复合物(SPIO-PLL)作为磁探针在体外标记 ADSCs,并用 MR 行细胞体外成像,为进一步将同种异体 ADSCs 移植于活体退变椎间盘内并示踪其增殖修复功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及仪器

3月龄清洁级雌性新西兰大白兔1只,体质量2.5 kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。胎牛血清(FBS,Hyelone 公司),磷酸缓冲液(PBS),低糖型 F12 细胞培养基(DMEM/F12,Gibco 公司),SPIO(由重庆医科大学附属第一医院放射科文明教授惠赠,专利号 ZL200710092512.5),Ⅰ型胶原酶、左旋多聚赖氨酸(PLL,Sigma 公司),一抗为鼠抗兔 CD34、CD44、CD90,二抗为结合荧光素 FTTC 标记的羊抗鼠 IgG-FITC(Abcam 公司),亚铁氰化钾和浓盐酸(天津恒兴试剂公司),双抗(北京碧云天公司),红细胞裂解液(武汉博士德公司)。CO_2恒温细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司),超净工作台(苏州净化设备公司),$T_2$000U 倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司),HitachiS-7500 透射电镜(日本 Hitachi 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),GE signa 3.0Tesla 核磁共振仪和腕关节线圈(美国 GE 公司),水浴箱,摇床,酶标仪,无菌手术包。

1.2 分离、培养及纯化兔 ADSCs[3]

用1%戊巴比妥钠(1 mL/kg)经耳缘静脉注射麻醉新西兰大白兔后,取仰卧位,消毒、备皮、铺巾、取双侧腹股沟区脂肪垫4 mL,PBS(含1%双抗)浸泡。迅速送往超净工作台,眼科镊剔除筋膜和血管,PBS 冲洗,眼科剪充分剪碎约 1 mm^3;转入 50 mL 锥形瓶内,加入5倍体积0.1% Ⅰ型胶原酶,37 ℃水浴箱振荡消化1 h至糊状,转入 50 mL 离心管,1 200 r/min 离心 10 min 并弃残余脂肪及上清,加入等体积 10% FBS DMEM/F12(含1%双抗)的细胞完全培养液,吹打混匀,1 000 r/min 离心5 min后弃上清,加入适量0.16 mol/L 红细胞裂解液充分混匀5 min,去除残余红细胞;1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入细胞培养液吹打混匀,分别用100和200钼网过滤,收集滤液,800 r/min 离心5 min,弃上清,重悬接种于 50 mL 细胞培养瓶,37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱孵育 48 h 后首次半定量换液,3 d 后全量换液,并记为第1代;待细胞生长达瓶底90%后用0.25%胰蛋白酶消化,按1∶2传代,依次计数代次,倒置相差显微镜动态观察细胞形态变化和生长状况。取第3代细胞为实验对象。

1.3 流式鉴定 ADSCs

收集处于生长对数期的第3代 ADSCs,调整细胞数约 1×10^6/mL,转入 1.5 mL EP 管中,PBS 漂洗 2 min×3 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min,弃固定液,PBS 漂洗 2 min×3 遍,10% 胎牛血清封闭 30 min,弃血清,分别滴加鼠抗兔 CD34(1∶500),CD44(1∶200),CD90(1∶200),室温孵育 1 h,4 ℃过夜,弃一抗,PBS 漂洗 2 min×3 遍,滴加羊抗鼠 IgG-FITC(1∶10),室温孵育 30 min,弃二抗,PBS 漂洗 2 min×3 遍,同时以 PBS 代替一抗作阴性对照,上机检测并分析数据。

1.4 磁标记 ADSCs 及普鲁士蓝染色

分别将 SPIO 用细胞培养基稀释成 25、50、75 μg/mL,依次加入 PLL(SPIO∶PLL 为1∶0.05),37 ℃恒温孵育 2 h 制成 SPIO-PLL 复合物[4]。将预先经多聚赖氨酸覆盖的细胞爬片置入 24 孔板内,每孔加入 1 mL 细胞悬液(细胞约 1×10^4个),培养过夜后弃上清,每孔分别加 25、50、75 μg/mL 的 SPIO-PLL 培养液 1 mL,每个浓度设 3 个复孔,以细胞培养液为空白对照组。孵育 24 h,弃上清,PBS 洗涤 5 min×3 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min,双蒸水洗涤 1 min×3 遍,Perls 反应液(2% 亚铁氰化钾 + 2% 盐酸等体积混匀)作用 30 min,弃去反应液,双蒸水洗涤 1 min×3 遍,0.5% 伊红复染 10 min,双蒸水洗去多余伊红、晾干,二甲苯透明处理 5 min 后中性树胶封片。镜下观察并计数,每个样本随机选择 3 个视野观察,胞质内见蓝色致密颗粒为普鲁士蓝染色阳性,并计算磁化标记率。

磁化标记率 = 细胞染色阳性数/细胞总数×100%

1.5 透射电镜检测磁标记 ADSCs

收集 5×10^6个经磁标记的 ADSCs,吹打混匀制成单细胞悬液,转入 1.5 mL EP 管中,离心(1 000 r/min,5 min),沿管壁缓

慢加入适量 2.5% 戊二醛溶液,4 ℃固定 2 h,1% 锇酸固定 30 min,0.5% 醋酸铀 4 ℃染色固定过夜,梯度乙醇脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀复染,透射电镜观察。

1.6 磁标记 ADSCs 体外 MR 成像

收集经 25、50、75 μg/mL SPIO-PLL 分别标记的 ADSCs (1×10^7个),同时收集相同数量未经磁标记的细胞作空白对照,吹打混匀制成单细胞悬液,分别转入 1.5 mL 装有 1% 琼脂糖溶液的 EP 管内,200 r/min 离心 2 min,涡旋振荡使细胞迅速充分混匀,4 ℃冷却固定 10 min 后行 MRI 成像,采用腕关节线圈。同法收集经 25 μg/mL SPIO-PLL 标记的 ADSCs 5×10^6个(磁标记 1 d)、1×10^7个(磁标记 1 d)、1×10^7个(磁标记 3 d),同时收集 1×10^7个 ADSCs(未标记)作空白对照。利用 MRI 仪上信号自动测量系统,设置 50 mm^2的圆形游标为感兴趣区,分别测量 3 个序列同层面各组细胞的信号强度,每个兴趣区重复测量3 次并取平均值,计算每种序列上信号强度衰减率:$\triangle SI=(SI_{标}-SI_{未标})/SI_{未标}\times100\%$,其中 $SI_{标}$和 $SI_{未标}$分别指标记细胞和未标记细胞的信号强度。运用多回波 SE T_1WI-mapping、FSE T_2-mapping 及 GRE T_2^*-mapping 序列对 EP 管行体外成像,通过 adw 4.4 工作站的 Functool 软件,测量以上标记细胞组的 T_1、T_2 及 T_2^* 弛豫时间。成像序列及参数:横轴面 T_1WI 采用 SE 序列,TR 400 ms,TE 12 ms,FOV 8 cm,层厚 2 mm,层间距 1 mm,激励次数 4,矩阵 320×256;T_2WI 采用 FSE 序列,TR 3 000 ms,TE 102 ms,FOV 8 cm,层厚 2 mm,层间距 1 mm,激励次数 3,矩阵 320×256;T_2^*WI 采用 GRE 序列,TR 250 ms,TE 12 ms,FOV 8 cm,层厚 2 mm,层间距 0.5 mm,激励次数 3,矩阵 320×224,翻转角 20°。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件,MRI 不同序列上磁标记细胞与未标记细胞组的弛豫时间采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 原代培养 ADSCs

原代接种时 ADSCs 为透亮的小圆形,含少量红细胞及脂滴;24 h 后镜下见短梭状、类圆形细胞贴壁;48 h 后贴壁细胞数增多,呈梭形、多角形,形如成纤维细胞,可见细胞集落;3 d 后细胞明显增殖,排列规则呈长梭形,簇状分布,有一定方向性;培养至第 3 代时细胞两端有突起并见极性,单核,纯度高,排列呈鱼群样、漩涡状(图 1)。



图 1 倒置显微镜观察第 3 代 ADSCs 变化 (×100)

2.2 流式细胞术鉴定 ADSCs

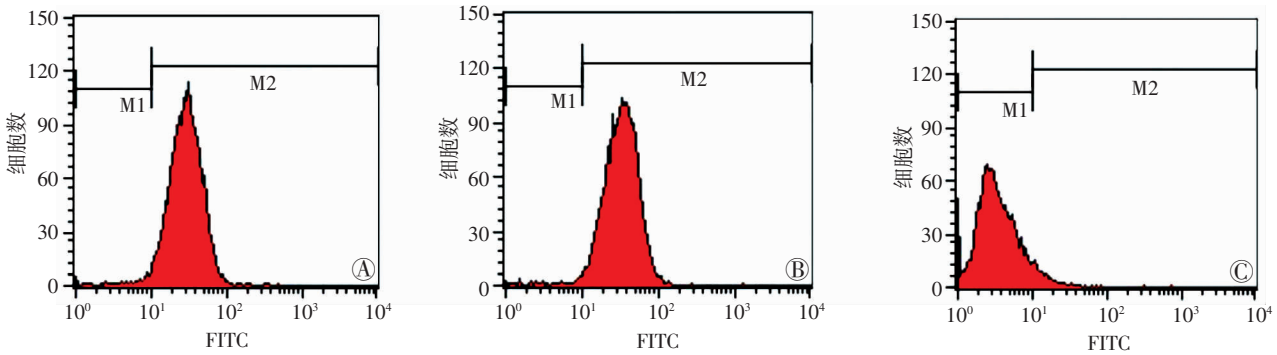
ADSCs 表面抗原 CD90(+)阳性表达率 99.2%(图 2A),CD44(+)阳性表达达率 98.7%(图 2B),CD34(−)检测结果为 4.6%(图 2C),几乎不表达。流式细胞术检测结果证实获得的原代细胞纯度高,具有 ADSCs 的表面抗原特性。

2.3 普鲁士蓝染色及电镜观察磁标记 ADSCs

磁标记细胞的胞浆内见数量不等的蓝染致密颗粒,镜下计数阳性细胞,磁标记率近 100%(图 3A),而未标记组呈阴性,胞浆呈红色,未见蓝色颗粒物质聚集(图 3B)。透射电镜见细胞质内大小不等的斑点状高密度致密颗粒,主要聚集在细胞质的囊泡结构(图 3C)。

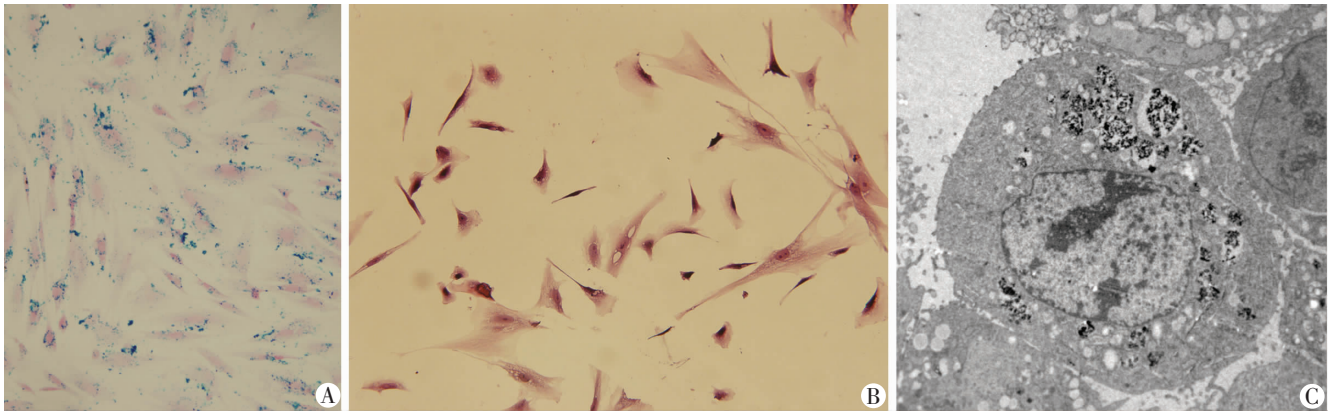
2.4 磁标记 ADSCs 体外 MR 成像

对经 25、50、75 μg/mL SPIO-PLL 磁标记的细胞组行体外 T_1WI、T_2WI 和 T_2^*WI 序列成像,其中随着磁探针浓度增加,3 个序列示标记细胞信号强度依次降低,其中 T_2^*WI 和 T_2WI 序列的信号强度变化较 T_1WI 序列明显。在 T_1WI、T_2WI 和 T_2^*WI 3 个序列中,1×10^7个(标记 1 d)的信号强度均分别较 5×10^6个(标记 1 d)和 1×10^7个(标记 3 d)者低(图 4)。T_1WI、T_2WI 和 T_2^*WI 3 个序列中 1×10^7个(标记 1 d)的信号强度变化率分别为 39%、64%、70%;1×10^7个(标记 3 d)的信号强度变化率分别为 18%、29%、48%,5×10^6个(标记 1 d)的信号强度变化率分别为 16%、26%、41%,后两组的数值均较 1×10^7个(标记 1 d)组低。3 个序列中,信号强度变化率 T_2^*WI 和 T_2WI 较 T_1WI 变化明显。磁标记各细胞组的弛豫时间方差分析结果显示 T_2^*WI 和 T_2WI 与 T_1WI 相比差异均有统计学意义($F=161.47$,$P<0.05$),但 T_2^*WI 与 T_2WI 的弛豫时间差异无统计学意义($F=5.88$,$P>0.05$)。



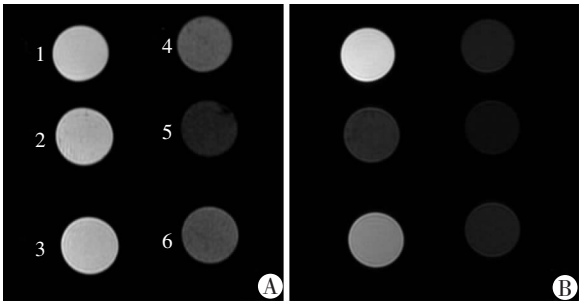
A:CD90(+);B:CD44(+);C:CD34(−)

图 2 流式细胞术检测 ADSCs 细胞表面抗原的表达



A:普鲁士蓝染色观察磁标记 ADSCs(×400) 胞浆内见数量不等的蓝染铁颗粒,标记率 100%;B:普鲁士蓝染色观察对照组细胞(×400) 胞浆呈红色,未见蓝染铁颗粒;C:透射电镜观察磁标记 ADSCs(×7 500) 胞浆内见多发含高密度铁粒子的囊泡结构

图3 磁标记 ADSCs 的形态学变化



1~6:分别为蒸馏水、琼脂、1×10^7 个细胞(未标记)、5×10^6 个细胞(标记 1 d)、1×10^7 个细胞(标记 1 d)、1×10^7 个细胞(标记 3 d);A:T_2MI;B:T_2^* MI;A、B 均显示 1×10^7 个细胞(未标记)信号为白色,1×10^7 个细胞(标记 1 d)为深灰色,5×10^6 个细胞(标记 1 d)和 1×10^7 个细胞(标记 3 d)为浅灰色,各序列示 1×10^7 个细胞(标记 1 d)的信号强度最低

图4 磁标记 ADSCs 体外 MR 表现

3 讨论

3.1 ADSCs 的特性

椎间盘内细胞数量和活性下降是引起退变的始发因素,维持椎间盘内环境稳态是保证椎间盘结构和功能的关键因素,但椎间盘细胞缺乏有效的增殖修复能力,因此,寻找一种新型的干细胞来治疗退变椎间盘具有深远意义。ADSCs 作为一种成体干细胞,与骨髓间充质干细胞(BMSCs)、脐血间充质干细胞(UCB-MSCs)、造血间充质干细胞(HSCs)、神经干细胞(NSCs)及胚胎干细胞(ESCs)相比,除具有自我更新和多项分化潜能之外,还有:①体内脂肪组织含量大,来源广,取材安全,通过无创或者微创(如抽脂术)的方式即可获得;②ADSCs 低免疫原性,可实现自体、同种异体及异种异体移植;③不涉及更多政治、社会法律及伦理方面的争议。因此 ADSCs 已成为再生医学的"热点"种子细胞[2,5-6]。研究报道 ADSCs 已成功通过自体或同种异体移植来治疗退变椎间盘及其他病变组织[7-8]。

3.2 ADSCs 的磁标记

目前,标记细胞的磁敏感剂主要包括钆类和氧化铁类,纳米铁粒径小,穿透力强,在低浓度(nmol 级)即可产生显著的负性对比效应。研究表明应用同浓度的两种试剂标记同种细胞,前者细胞内的含量是后者的 5 倍,但后者的弛豫率却是前者的 7~10 倍,同时纳米铁经细胞组织生物降解后可以进入体内正常的铁代谢[9-10]。国内外研究证实 SPIO 可有效标记来源于不同物种的多种干细胞[6,11-13],是一种理想的 MRI 示踪剂。

本研究中 SPIO 颗粒直径 50 nm,在安全浓度范围内,较大径 SPIO 颗粒能显著干扰磁场的均匀度,加速周围氢质子失相位,缩短质子弛豫时间,其中 T_2 弛豫时间变化明显比 T_1 显著。磁标记后信号强度在 T_1WI 序列轻微减低,T_2WI 序列减弱较明显,而在 T_2^*WI 序列中,由于氢质子对磁场不均匀更加敏感,随着 SPIO 浓度的不断增加,信号强度下降更显著,从而可以实现单细胞或细胞群体外低分辨率 MR 的显像。本实验中应用葡聚糖包被 SPIO,既增加了 SPIO 的稳定性、亲水性和生物相容性,又避免 SPIO 对靶细胞的直接毒性作用。通过 PLL 和 SPIO 之间的电荷作用制成理化性质稳定的 SPIO-PLL 复合体(SPIO: PLL 为1:0.05[4]),由于细胞膜和 SPIO-PLL 分别带负电荷和正电荷,二者通过静电作用相互吸引,磁探针与细胞表面受体结合,以小泡的形式进入胞浆,从而安全有效地标记 ADSCs。

普鲁士蓝染色显示 SPIO-PLL 对兔 ADSCs 的磁标记率近100%;电镜显示致密铁颗粒主要聚集在胞浆内的囊泡,这与国外研究[14]的结论是吻合的。

3.3 磁标记 ADSCs 的 MR 成像

本实验在体外用不同浓度的 SPIO-PLL 标记 ADSCs,标记组与未标记组相比较,标记组在 T_1WI、T_2WI 和 T_2^*WI 3 个序列中信号强度较未标记组均有不同程度减低。随着标记浓度不断增加,标记组信号强度下降程度越明显,信号强度变化率越大。其中 T_2^*WI 序列的信号强度变化率最明显,这是由于铁原子核外高速旋转的单电子置入外加高磁场时,其磁敏感性增强,加速氢质子失相位。这种由铁粒子引起周围磁场不均匀的能力远远超过其粒径本身的现象,被称为"放大"效应[4]。

本实验用同浓度的 SPIO-PLL(25 μg/mL)分别标记 1×10^7个 ADSCs(标记 1 d)、5×10^6个(标记 1 d),3 个序列的结果显示前者的信号强度均较后者低,提示磁标记细胞数量和信号强度之间存在比例关系,可为下一步通过测定信号强度来推测移植细胞的存活数量提供依据,对活体示踪移植干细胞的迁移转归和增殖具有重要指导意义。同时,通过比较 1×10^7个(标记 3 d)和 1×10^7个(标记 1 d)的信号强度及其变化率,各序列示前者的信号强度明显较后者高,这可能与随着时间延长,细胞不断分裂增殖或通过细胞自身的生物降解使对比剂逐渐稀释至最后消失有关,因而是否可以通过靶区的信号变化来评估移植细胞的分裂增殖水平及监测磁标记干细胞的治疗周期,需要进一步研究证实。

综上所述,通过微创可获得足量的 ADSCs,为临床移植 ADSCs 治疗提供理想的种子细胞。SPIO-PLL 作为负性对比剂可有效标记 ADSCs,临床型 3.0 T MR 可以对磁标记 ADSCs 行体外细胞成像,磁标记细胞的信号强度及其信号强度变化率在 T_2^*WI 与 T_2WI 变化明显。因此,应用 SPIO 标记 ADSCs 行干细胞移植并 MRI 活体实时示踪其在靶区的迁移、增殖及分化转归是一种高效无创的方法。基于椎间盘缺乏神经血管支配,是体内的"免疫豁免组织"[1],目前本研究组已成功将磁标记的 ADSCs 移植到同种异体兔退变的腰椎间盘组织内,并行 MRI 动态示踪靶细胞,初步评价 ADSCs 在修复退变椎间盘组织再生中的作用。

参考文献:

[1] Hughes S P, Freemont A J, Hukins D W, *et al*. The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain[J]. J Bone Joint Surg Br, 2012, 94(10): 1298-1304.

[2] Zuk P A. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead[J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(11): 1783-1787.

[3] Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, *et al*. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(12): 4279-4295.

[4] Zhang H. Iron oxide nanoparticles-poly-L-lysine complex[M]//Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2004-2013.

[5] Arana M, Mazo M, Aranda P, *et al*. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization[J]. Methods Mol Biol, 2013, 1036: 47-61.

[6] Lin C S, Xin Z C, Deng C H, *et al*. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture[J]. Histol Histopathol, 2010, 25(6): 807-815.

[7] Chun H J, Kim Y S, Kim B K, *et al*. Transplantation of human adipose-derived stem cells in a rabbit model of traumatic degeneration of lumbar discs[J]. World Neurosurg, 2012, 78(3/4): 364-371.

[8] Ganey T, Hutton W C, Moseley T, *et al*. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(21): 2297-2304.

[9] Qi Y, Feng G, Huang Z, *et al*. The application of super paramagnetic iron oxide-labeled mesenchymal stem cells in cell-based therapy[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(3): 2733-2740.

[10] Daldrup-Link H E, Rudelius M, Oostendorp R A, *et al*. Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents[J]. Radiology, 2003, 228(3): 760-767.

[11] 陈双庆, 蔡庆, 沈玉英, 等. 磁标记神经干细胞在 APP/PS1 转基因阿尔茨海默病小鼠脑内迁移的 MRI 研究[J]. 中华放射学杂志, 2013, 47(3): 250-254.

[12] Barczewska M, Wojtkiewicz J, Habich A, *et al*. MR monitoring of minimally invasive delivery of mesenchymal stem cells into the porcine intervertebral disc[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74658.

[13] 居胜红, 滕皋军, 毛曦, 等. 脐血间充质干细胞磁探针标记和 MR 成像研究[J]. 中华放射学杂志, 2005, 39(1): 101-106.

[14] Schafer R, Kehlbach R, Wiskirchen J, *et al*. Transferrin receptor upregulation: *in vitro* labeling of rat mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide[J]. Radiology, 2007, 244(2): 514-523.

(**收稿**:2013-12-10;**修回**:2013-12-29)

(编辑 汪勤俭)