超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞的实验研究

陶忠芬[1],江 澈[2],李 飞[1],路 菊[1],张正治[1] (1. 第三军医大学基础医学部中心实验室,重庆 400038;2. 重庆三峡中心医院培训中心,重庆 404000)

[摘 要] **目的** 探讨超顺磁性氧化铁纳米颗粒(SPIO)标记青山羊骨髓间充质干细胞的方法,并确定标记颗粒在细胞内的具体位置,评价标记效果。**方法** 抽取骨髓离心,分离间充质干细胞制成单细胞悬液传代培养及扩增,用 SPIO 标记第三代骨髓间充质干细胞,显微镜下观察发现细胞内胞吞入大量 SPIO 颗粒后消化培养细胞,离心成团,于 2.5% 戊二醛固定,透射电镜常规制样,镜下观察并采集图像。**结果** 电镜下骨髓间充质干细胞的超微结构保存良好,胞质内出现大量电子密度高的 SPIO 颗粒,呈小团状或点状分布,主要位于溶酶体内及滑面内质网、线粒体及胞浆中的膜性结构上,细胞膜表面和核膜上也可见少量的散在颗粒。**结论** 透射电镜下显示用 SPIO 标记骨髓间充质干细胞阳性率高,超微结构保存良好,准确定位了 SPIO 在胞内的位置,此法可为干细胞移植的示踪提供依据。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;超顺磁性氧化铁;透射电镜
[中图分类号] R329.2;Q-336 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)01-0022-03

Experimental study on superparamagnetic iron oxide labeled bone marrow mesenchymal stem cells

TAO Zhong-fen, JIANG Che, LI Fei, LU Ju, ZHANG Zheng-zhi (Department of Central Laboratory, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the methods of labeling bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) with superparamagnetic iron oxides (SPIO) as well as to confirm the location of SPIO in BMMSCs and to evaluate the labeling effect. **Methods** BMMSCs were isolated from grey goat and purified for subsequent steps. SPIO particles and the third generation of BMMSCs were cultured together till lots of SPIO particles were founded in the cell through microscope. The cells were digested and centrifuged to be a pellet and then were fixed by 2.5% pentadialdehyde. Samples were prepared for transmission electron microscope (TEM) examination and TEM pictures were captured for analysis. **Results** The ultrastructure of BMMSCs was well preserved. Abundant granules were found in cytoplasm, such as lysosome, smooth endoplasmic reticulum and mitochondrion. Small amount of interspersed granules were found on cell membrane and nuclear membrane. **Conclusion** TCM observation showed that the rate of positive cell that labeled by SPIO was high, the ultrastructure was well perserved and the location of SPIO was confirmed in the cell. This technique laid a foundation for the tracing of the stem cell transplantation.

Keywords: bone marrow mesenchymal stem cells; superparamagnetic iron oxide; transmission electron microscope

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是干细胞家族的重要成员,来源于发育早期的中胚层和外胚层。MSCs 存在于骨髓基质中,形态呈纤维状,可聚集成均匀集落,体外培养呈漩涡状排列,既往认为 MSCs 主要功能是对骨髓造血系统细胞起支持和连接作用。近年研究表明 MSCs 具有自我复制、多向分化的干细胞生物学特性,有高度增殖潜力,可分化为多种间叶组织细胞,进行相应组织修复。骨髓 MSCs 获取方便,体外扩增容易,连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能,是促组织工程血管化优良的种子细胞来源[1],可用于衰老和病变引起的组织器官损伤修复,同时因其移植未涉及伦理,因此骨髓间充质干细胞在体内的移植治疗成为近年来研究的热点。如何标记移植的骨髓间充质干细胞及观察其分化、生长情况一直是研究探索的重点。本实验采用超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)标记体外培养的骨髓间充质干细胞,标记后通过透射电镜观察,探寻 SPIO 的胞内标记位置,并评价其标记效果,可为干细胞移植的示踪提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

5 月龄青山羊 12 只(第三军医大学实验动物中心提供),体重 30 ~ 35 kg,雌雄不拘。SPIO(四川大学生物材料中心提供),2.5% 戊二醛溶液(国药集团化学试剂有限公司,进口分装 FEM 专用)。

[作者简介] 陶忠芬(1977 -),女,重庆市荣昌县人,实验师,主要从事电镜技术应用方面的研究。电话(023)68752348, E-mail: taozhongfen@163.com
[通迅作者] 张正治,教授,电话:(023)68752346
[收稿日期] 2010-10-15 [修回日期] 2010-11-16

1.2 骨髓间充质干细胞的获取及原代培养

动物用 0.1 mg/kg 速眠新Ⅱ注射液肌肉注射麻醉,固定四肢,剃除术区羊毛,常规碘伏消毒,铺无菌治疗巾。用 16 号骨髓穿刺针于一侧髂骨做骨髓腔穿刺,待感到有明显的落空感后,用肝素(肝素用生理盐水稀释,浓度为 100 U/mL)预湿的 20 mL 注射器抽取骨髓 6 mL,每一穿刺点抽取骨髓约 2 mL,缓慢沿管壁加入到含等体积比重为 1.073 的淋巴细胞分离液的离心管中,以 2 500 ~ 3 000 r/min 离心 30 min,吸取中间乳白色云雾状有核细胞层,加入 0.01 mol/L PBS 缓冲液 5 mL 反复吹打漂洗,1 500 r/min 离心 6 min,再次用 0.01 mol/L PBS 缓冲液漂洗离心 1 次,弃上清,在沉淀中加入原代培养液 5 mL,反复吹打制成单细胞悬液,经血球计数板计数细胞后,以每平方厘米 3×10^5 个有核细胞接种培养瓶,37 ℃下 5% CO_2 饱和湿度培养箱内孵育,3 d 后首次全量换液,弃去大量悬浮的细胞,以后隔日换 2/3 量培养液,每日在倒置相差显微镜下观察记录细胞生长状况和形态变化。待细胞生长至 80% ~90% 融合,随即进行传代培养。

1.3 骨髓间充质干细胞的传代培养及扩增

弃去原代培养瓶内的培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶/0.01% EDTA 混合消化液 2 mL,摇晃培养瓶,使消化液完全流过培养瓶底,弃去消化液,重新加入消化液 5 mL,密闭 37 ℃下消化 1 ~3 min,在倒置相差显微镜下观察细胞间隙变大、细胞变圆、部分细胞游离后,加入等量体积细胞完全培养液终止消化;吸管轻轻吹打使贴壁细胞完全脱壁,并使细胞团完全分散,收集含骨髓间充质干细胞的酶溶液于离心管内,以 1 000 r/min 离心 5 min;弃去上清,用 0.01 mol/L PBS 缓冲液 5 ~ 10 mL 反复吹打漂洗,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,在细胞沉淀中加入适量细胞完全培养液,充分吹打制成单细胞悬液;收获细胞计数后,以每平方厘米 1×10^5 个细胞接种培养瓶,并补加完全培养液,37 ℃下 5% CO_2 饱和湿度培养箱内孵育。隔日换2/3 量培养液,每日在倒置相差显微镜下观察记录细胞生长状况和形态变化,取第三代细胞用于实验研究。

1.4 SPIO 标记骨髓间充质干细胞

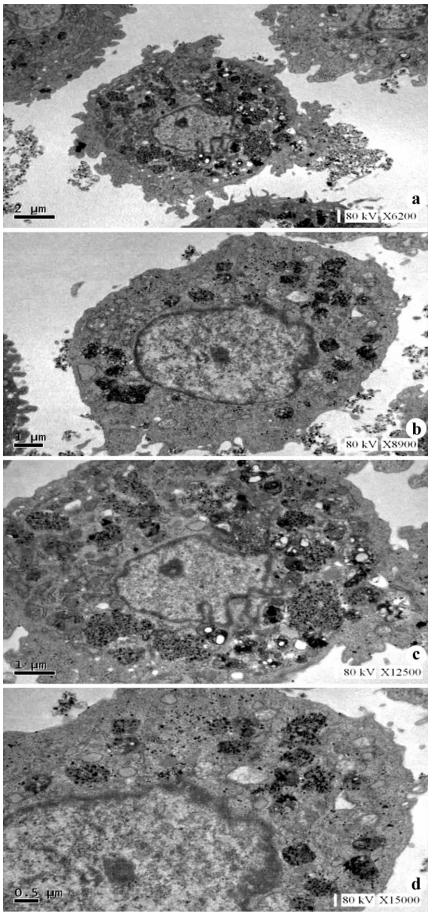
第三代细胞长至细胞密度达 90% 时,0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次,加入含 SPIO 10 ng/mL 的 DMEM/F-12(含 10% FBS)培养液 15 mL,继续培养 24 h 后显微镜下观察,见细胞内胞吞入大量 SPIO 颗粒。弃去原代培养瓶内的培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶/0.01% EDTA 混合消化液 2 mL,摇晃培养瓶,使消化液完全流过培养瓶底,弃去消化液,重新加入消化液 5 mL,密闭 37 ℃消化 1 ~3 min,在倒置相差显微镜下观察细胞间隙变大、细胞变圆、部分细胞游离后,加入等量体积细胞完全培养液终止消化;吸管轻轻吹打使贴壁细胞完全脱壁,并使细胞团完全分散,收集含骨髓间充质干细胞的酶溶液于离心管内,以 1 000 r/min离心 5 min;弃去上清,用 0.01 mol/L PBS 缓冲液 5 ~ 10 mL反复吹打漂洗,1 000 r/min 离心 5 min,细胞成团,弃去上清液后于 2.5% 戊二醛溶液中 4 ℃下固定。

1.5 透射电镜制样

细胞经 2.5% 戊二醛溶液(4 ℃)固定 2 h,用 0.1 mol/L PBS (pH 7.2 ~7.4)漂洗 3 次,每次 30 min,后经 1% 锇酸后固定、丙酮梯度脱水、浸透、环氧树脂 618 包埋、超薄切片、铀-铅双染色等步骤处理,经荷兰飞利浦 TECNAI 10 型透射电子显微镜观察并采集图像。

2 结果

在透射电镜下观察,骨髓间充质干细胞超微结构清晰,形态保存良好。低倍下观察图像反差效果好,标记物特异性强,SPIO 颗粒标记效果明显,阳性反应产物较高(图 1a)。胞质中出现大量电子密度高的 SPIO 颗粒,颗粒呈小团聚集或散在点状分布,着色深,颗粒大小不均,主要位于溶酶体、线粒体内部及滑面内质网或胞内其他膜性结构上(图 1b)。高倍放大可见细胞膜表面和核膜表面也有少量的散在颗粒,着色较浅,颗粒较小(图 1c);胞浆内清晰可见大量散在颗粒(图 1d);细胞核内未见阳性反应产物。



a:低倍下胞浆内可见大量电子致密物沉积(×6 200);b:低倍下 SPIO 颗粒呈小团聚集或散在点状分布(×8 900);c:高倍下胞膜和核膜表面也可见少量致密物沉积(×12 500);d:高倍下胞浆内清晰可见大量散在颗粒(×15 000)

图 1 SPIO 标记骨髓间充质干细胞透射电镜观察

3 讨论

骨髓间充质干细胞可以分泌多种细胞因子,这些

细胞因子参与了造血功能的调控。同时,也能分泌胶原、蛋白多糖、透明质酸酶等物质,为造血干细胞在机体内迅速归巢提供了结构上的支持。研究发现,骨髓间充质干细胞具有不同的分化方向和分化能力,在特定诱导条件下,大部分骨髓间充质干细胞在受体体内能够迁移,分化为多种细胞,包括成骨细胞、软骨细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞等,还可以在一定条件下转化为肝细胞、胰岛细胞、肾小管细胞等。因此体外培养扩增骨髓间充质干细胞可作为组织工程中理想的种子细胞,但目前还没有固定的细胞标记物。SPIO可以有效地进行骨髓间充质干细胞标记,而这种标记方法不会影响细胞的活力、生长、分裂、迁移、分化等生物学功能,对细胞没有毒性,具有良好的安全性[2]。磁性标记干细胞具有无创、可连续进行等优点,已被广泛应用于干细胞移植治疗脑、心肌、肝脏和肾脏损伤的体内示踪研究[3]。

SPIO是目前最常用的干细胞标记物,具有以下优势:①明显增加MRI检测的敏感性;②有多种商用的SPIO试剂如Endorem和Resovist等可供选择;③很低浓度的SPIO即可被检测到,因而降低了细胞的潜在毒性;④一定浓度的SPIO是安全的,可以通过生物降解的形式进入铁代谢循环[4]。SPIO作为标记物自出现即受到广大研究者的关注,大量有关干细胞的研究均采用了这种标记物。如Hauger等[5]将SPIO标记的MSC静脉输入肾小球损伤的动物体内,取损伤肾组织进行检测,通过普鲁士兰染色、免疫荧光和MRI等方法进行检查都提示阳性。大部分研究者均采用了光镜染色及MRI技术进行标记的阳性检查[6],但对SPIO在胞内的具体标记部位却未予详细说明。李俊峡等[7]曾在成肌细胞的标记研究中发现标记细胞质膜下可见大小不一的空泡状结构,高密度的铁粒子存在于空泡内外,但同样未明确指出SPIO在胞内标记的具体位置。

本研究利用SPIO标记骨髓间充质干细胞,标记后通过透射电镜观察显示SPIO在细胞内主要聚集部位为溶酶体,同时在线粒体内部、内质网膜上也有颗粒发现,说明SPIO颗粒在细胞内部并没有专一的聚集部位,在多种细胞器均可存在。高倍镜下发现细胞膜上与细胞核膜上亦有颗粒存在,说明SPIO被吞入细胞后即分散到各种膜性细胞结构上。

在利用SPIO进行细胞标记的透射电镜实验研究中,首先要获得理想的阳性反应产物,其次要保证超微结构保存良好,这样才能准确定位SPIO的标记位置。由于整个实验步骤复杂,影响因素多,在光镜下又无法对SPIO颗粒准确定位,所以在实验研究中一定要注意以下几点:①SPIO用于干细胞标记的浓度和剂量要适当,张瑞平等[8]总结前人的研究结果得出20~50 μgFe/mL为安全而又有效的标记浓度,SPIO标记细胞对细胞的活性、生存能力、功能、分化无不利影响,也无毒性,低于20 μgFe/mL培养液则无法有效标记或需增加标记后的孵育时间,高于50 μgFe/mL培养液将使细胞的生物学活性受到不同程度的抑制;②SPIO标记与干细胞的生长、标记时间密切相关,在进行标记时要不断摸索并严格控制这两个因素;③控制培养液的浓度、消化液的浓度和消化时间,防止细胞受到影响发生变形;④注意控制细胞离心的速度大小和离心时间,以防止外力损伤,有利于保存良好的超微结构;⑤干细胞培养过程中要不断监测细胞的生长状况、形态变化、细胞内铁颗粒的分布及标记情况,并及时终止培养进行后续研究。

移植细胞的示踪在干细胞研究中起着不可代替的作用,在组织工程和细胞治疗方面具有广阔的应用前景[9]。采用电镜技术观察SPIO标记骨髓间充质干细胞,能清楚地分辨SPIO标记阳性细胞,并可对细胞内的超顺磁性氧化铁纳米颗粒进行准确的定位,有利于干细胞移植研究的开展。

[参考文献]

[1] 冯 滨,刘迎龙.干细胞-心脏组织工程瓣种植细胞的新来源[J].中华胸心血管外科杂志,2004,20(6):377-379.

[2] 何庚戌,要 彤,幺 雯,等.超顺磁性氧化铁作为细胞标记试剂的可行性研究[J].华北国防医药,2009,21(2):9-11.

[3] 刘 宇,邓宇斌,张德胜,等.蛛网膜下腔移植SPIO标记的MSCs在大鼠脊髓损伤模型的MR活体示踪研究[J].中国医学影像技术,2009,25(11):1933-1936.

[4] Ju S,Teng GJ,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.

[5] Hauger O, Frost EE, van Heeswijk R, et al. MR Evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy [J]. Radiology,2006,238(1):200-210.

[6] 张文高,杨学军.SPIO在非吞噬细胞成像中的应用及研究进展[J].国际医学放射学杂志,2008,31(6):473-475.

[7] 李俊峡,张卓立,张 莉.超顺磁性氧化铁纳米粒子标记成肌细胞方法研究[J].第四军医大学学报,2007,28(17):1551-1554.

[8] 张瑞平,刘 强,李 晶,等.超顺磁性氧化铁标记鼠骨髓间充质干细胞的体外MR成像研究[J].中国医学影像学杂志,2009,17(4):257-261.

[9] 刘伯轩,刘师伟,王建华,等,DAPI标记的骨髓间充质干细胞体内外示踪实验研究[J].药物与临床,2009,9(8):703-705.

(编辑:左艳芳)