技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)03-0378-04

探讨不同浓度 SPIO 对人成纤维细胞标记率和细胞活力影响及其 MRI 的实验研究

郑 娟[1],王顺和[1],文 明[2],黄铀新[2],李必波[3],李晗宇[1]

(1.重庆医科大学基础医学院病理科 重庆市干细胞与组织工程实验室,重庆 400016;2.重庆医科大学附属第一医院放射科,重庆 400016;3.重庆医科大学药学院药学系,重庆 40016)

【摘 要】目的:探讨不同浓度超顺磁性氧化铁纳米粒子(Super-paramagnetic iron oxide,SPIO)体外标记人成纤维细胞(Human fibroblast cells,Hfbs)的磁性标记率、对细胞生长活力的影响,以及体外磁共振成像(Magnetic resonance imaging,MRI)成像的特征。方法:将单纯 SPIO(铁浓度为 200 μg/ml)、不同浓度的 SPIO-多聚赖氨酸复合物分别与培养基混合(铁的终浓度分别为 150、100、50、25 μg/ml,PLL 终浓度为 7.5 μg/ml),加入 Hfbs 共同培养 12、24、48、72 h 后收集细胞。采用台盼蓝排除试验检测细胞活性和普鲁士蓝染色法检测细胞铁分布。运用光学显微镜、透射电镜观察铁颗粒在细胞内的位置、计算其标记率;MR 扫描观察细胞信号强度变化情况。结果:SPIO-多聚赖氨酸复合物组细胞标记率显著高于单纯 SPIO 标记组($P<0.05$),台盼蓝排除试验显示,100 μg Fe/ml 及其以下浓度组细胞活力与对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。普鲁士蓝染色显示每个标记细胞胞质内可见多少不等的蓝染铁颗粒,电镜显示铁颗粒集中于内涵体和溶酶体中;含量在 25~50 μg Fe/ml 的培养液是 SPIO 标记干细胞的安全浓度,在此浓度阈值标记后孵育 18~24 h 即可有效标记细胞 95%~100%;MR 扫描显示标记细胞信号强度明显降低。结论:自制合成的 SPIO-多聚赖氨酸复合物可以简便、安全的标记人成纤维细胞。并且在适当浓度 25 μg Fe/ml 标记细胞不仅标记效率高,而且对细胞活力无明显影响,SPIO 标记细胞明显降低 MR 扫描下的细胞信号强度。

【关键词】人成纤维细胞;超顺磁性氧化铁;磁共振成像

【中国图书分类法分类号】R445.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-10-20

A study on labeling efficiency, cellular viability and in vitro MRI of human fibroblast cells labeled with SPIO of different concentration

ZHENG Juan, et al

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the efficiency of super-paramagnetic iron oxide (SPIO) of different concentrations in vitro labeling human fibroblast cells as well as the influence on cellular viability, and to investigate the characteristics of magnetic resonance imaging. *Methods*: Respectively mix pure SPIO (concentration of iron: 200 μg/ml) and SPIO-PLL compound of different concentrations with substrate (final concentrations of iron: 150, 100, 50, 25 μg/ml; final concentration of PLL: 7.5 μg/ml). Then incubate it with Hfbs for 12, 24, 48 h and 72 h. Collect the cells. Assess cellular viability with Trypan Blue Dye Exclusion Method; test iron particles distribution in cells with Prussian blue Stain; observe the positions of iron particles with optical microscope and TEM and calculate the labeling rate of SPIO; perform MR scanning to measure the signal intensity change of the cells. *Results*: Labeling efficiency of SPIO-PLL compound is much higher than that of pure SPIO ($P<0.05$). Trypan Blue Dye Exclusion test shows the viability difference between the cells labeled with 100 μg Fe/ml or lower iron content solutions and the comparison is not statistically significant ($P>0.05$). Prussian blue Stain test shows there are more or less blue dyed iron particles inside cytoplasm of each labeled cells. And those iron particles concentrate in endosome and lysosome (with electron microscope). Culture solution of concentration in the range of 25~50 μg Fe/ml is safe for labeling stem cells with SPIO, and 95%~100% of the cells will be effectively labeled in 18~24 h. And the MR scanning shows obvious reduction of signal intensity of the labeled cells. *Conclusion*: Human fibroblast cells can be easily and safely labeled with self-made SPIO-PLL compound. Labeling with appropriate solution (iron content of 25 μg/ml) is highly efficient and has little influence on cellular viability, furthermore, with SPIO labeling, the signal intensity of cells scanned with MR is dramatically reduced.

【Key words】Human fibroblast cells; Super-paramagnetic iron oxide; Magnetic resonance imaging

作者介绍:郑 娟(1981-),女,硕士,研究方向:神经病理学。

通讯作者:王顺和,男,教授,E-mail:wangshunhe120@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金资助(编号:30940021)、重庆市自然科学基金资助(编号:2008BB5209)。

目前,对脑脊髓疾病的临床治疗停留在缓解症状和控制疾病的发展阶段。有研究发现,成年哺乳动物脑组织中存在的神经干细胞可以分化成神经组织,表明中枢神经系统也存在再生修复能力[1,2],采用干细胞移植治疗是一种可能治愈该类疾病的有效手段[3],但移植后干细胞的分布、迁移、分化及转归等生物学行为一直是争论的话题。传统方法多采用荧光染料或染色体等作为标志物对移植的干细胞示踪,但只能在离体状态下通过组织学检查来进行,虽然该方法具有较高的标记效率,但最大的问题在于无法在活体内显示标记细胞。这不仅不利于在动物实验中动态地显示移植细胞的成活及迁移情况,更限制了细胞移植在临床中的应用。

磁共振成像(Magnetic resonance imaging,MRI)是最近出现的显微影像技术,具有较高的分辨率,因其能够分辨近似于细胞大小的组织[4],理论上讲能够动态跟踪移植细胞,当然须经 MRI 对比剂标记后才能与背景组织区别,而被 MRI 检测到。超顺磁性氧化铁纳米粒子(Super-paramagnetic oxide iron particle, SPIO)具有强大的 T_2 正性效应[5]。是一种良好的 MRI 对比剂。本实验旨在采用 SPIO-PLL 复合物标记人成纤维细胞,探讨不同标记时间、不同浓度的磁性标记率,标记后的细胞形态改变以及体外 MRI 特点,寻求一种最佳的标记方法,为下一步活体内示踪试验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人成纤维细胞株(细胞免疫荧光显示呈 Vimentin 阳性)。系重庆医科大学干细胞与组织工程实验室提供。

1.1.2 主要实验试剂及主要仪器设备 葡聚糖包被的 SPIO 为本课题组自制[6]。Maxi-Mix 旋涡混合器,美国 Thermolyne 公司。多聚赖氨酸(Poly-lysine,PLL)(美国 Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青公司)。细胞培养基 RPMI-1640、胰蛋白酶、台盼蓝、普鲁士蓝等试剂以及细胞培养试验场所和主要仪器由重庆医科大学神经干细胞与组织工程实验室提供。美国 GE 公司 1.5 T 磁共振成像仪。

1.2 实验方法

1.2.1 人成纤维细胞 SPIO 标记 不同时间标记细胞:设含不同浓度 SPIO 的培养基与细胞共同孵育时间分别为 12、24、48、72 h 后收集细胞观察标记率,及细胞形态有无改变,以选择最佳标记时间。不同浓度 SPIO 标记细胞:将 SPIO 与等容积的 PLL 混入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中(PLL 和铁的终浓度分别为 1.5 μg/ml 和 25、50、100、150 μg/ml),置于 37℃ 涡旋振荡仪中孵育 60 min 合成不同浓度的 SPIO-PLL 复合物的标记培养基。将其分别加入含 1×10^5 个/孔细胞的 24 孔板中,置于 5% CO_2 培养箱中孵育不同时间后收集细胞。设未标记细胞为对照 A 组,SPIO-PLL 标记 25 μg Fe/ml 作 B 组,50 μg Fe/ml 作 C 组,100 μg Fe/ml 作 D 组,150 μg Fe/ml 作 E 组,单纯 SPIO 标记(未经 PLL 修饰,Fe 浓度为 200 μg/ml)作 F 组,每组设 4 孔。

1.2.2 病理学分析 分别于细胞标记后 1 d、1 周、2、3、4 周行细胞活性检测及细胞铁染色,并与未标记细胞对照。

1.2.2.1 细胞活性检测 采用台盼蓝排除试验。吸去培养板中含 SPIO-PLL 复合物培养基,PBS 液洗涤 3 次,胰酶消化,离心收集后制成细胞悬液,用巴氏吸管各取 1 滴细胞悬液与 1 滴台盼蓝混合滴入细胞计数板,镜下观察,计数 100 个细胞。细胞活力(台盼蓝拒染率) = 染色阴性细胞数 /100 个细胞 × 100%。

1.2.2.2 铁染色 采用普鲁士蓝染色。吸去培养板中含 SPIO-PLL 复合物培养基,PBS 液洗涤 5 min × 3 次,进行普鲁士蓝染色:4% 多聚甲醛固定 40 min,PBS 液洗涤 3 次,在 Perl 试剂(2%亚铁氰化钾 +6%盐酸水溶液)中孵育 30 min,PBS 液洗涤 3 次,1% 核坚固红复染 3 min,PBS 洗去多余核坚固红后,应用光学显微镜对各个样本分别照像,然后在照片上分别计数细胞总数和普鲁士蓝染色阳性细胞数,细胞标记率 = 普鲁士蓝染色阳性细胞数/细胞总数 × 100%。

1.2.2.3 透射电镜检测 标记细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化制成悬浮细胞,1 800 r/min 离心 18 min 后转入 1 ml EP 管,弃去上清液后加入 2.5% 戊二醛溶液,4℃ 固定 1 h,1 000 r/min 离心 5 min,弃固定液,1% 锇酸固定 1 h,梯度丙酮脱水,环氧树脂包埋,切片,醋酸双氧铀及枸橼酸铅染色,电镜下观察。

1.2.3 标记细胞 MRI 体外成像 以含不同浓度铁粒子的培养基标记人成纤维细胞,24 h 后消化提取细胞及同批未标记细胞,调整细胞浓度为 2×10^5 个 /ml,另外用无铁培养基,蒸馏水作为对照。按照不同标记细胞浓度分置于 1.5 ml Eppendorf 管中,置入水盒内进行体外 MRI 扫描。采用 1.5-T MR 成像仪横断位扫描。3 英寸表面线圈固定线圈。扫描参数为:GRE(梯度回波)序列,TR/TE 225/5.3 ms,翻转角 30°,视野 8.0 mm,层厚 1.8 cm,矩阵 256 × 256。分别沿各管内径勾画感兴趣区(Region of interest,ROI),测定各管信号值及背景信号值,计算信噪比(Signal-to-noise ratio,SNR)管内信号值/背景信号值。

1.3 统计学分析

对测量结果以($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS10.0 统计分析软件进行方差分析,组间多重比较采用 LSD 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同时间 SPIO 标记细胞的比较

普鲁士蓝染色显示:含铁培养基和细胞共培养 12 h 仅见少许蓝染颗粒存在细胞质中,18 ~24 h 见大量蓝染颗粒存在于细胞质中,细胞形态未发生改变,呈梭形、大多角形和扁平星形,48 h 以上见细胞数量减少,形态改变,体积缩小,细胞内仍可见蓝染颗粒,少许细胞已溶解、死亡。未标记细胞及单纯 SPIO 组普鲁士蓝染色后细胞内未见蓝染颗粒。

2.2 不同浓度 SPIO 对标记细胞的存活影响及标记效率

2.2.1 磁标记对成纤维细胞生长活力的影响 不同浓度组

之间的台盼蓝拒染率有显著差异（F=141.05，P<0.001），150 μg/ml 浓度组显著低于对照组，P<0.001。与其他各组比较，P<0.05。100 μg/ml 及其以下浓度组与对照组比较差异无统计学意义（P>0.05）。（见表 1）

2.2.2　不同浓度 SPIO 的磁性标记率　普鲁士蓝染色阳性标记细胞胞质内存在蓝色铁颗粒，细胞呈淡蓝色至深蓝色不等，部分蓝色颗粒聚集成团，染色的深浅程度与标记时间的增加、所加 SPIO 的剂量成正相关（见图 1~6）。未标记细胞 A 组：标记率为 0%（见图 1），SPIO-PLL 复合物 B 组（25 μg Fe/ml）标记率为 94.5%（图 2），C 组（50 μg Fe/ml）标记率为 97%（图 3），D 组、E 组（100 ~150 μg Fe/ml）标记率均为 100%（图 4）。单纯 SPIO（未加 PLL）F 组：标记率为 12.5%（图 6）。随标记时间的不断增加而增加，SPIO 浓度 ≥ 100 μg/ml 导致细胞形态的改变，细胞出现少许溶解征象（图 5）。

2.3　不同浓度 SPIO 标记细胞电镜观察

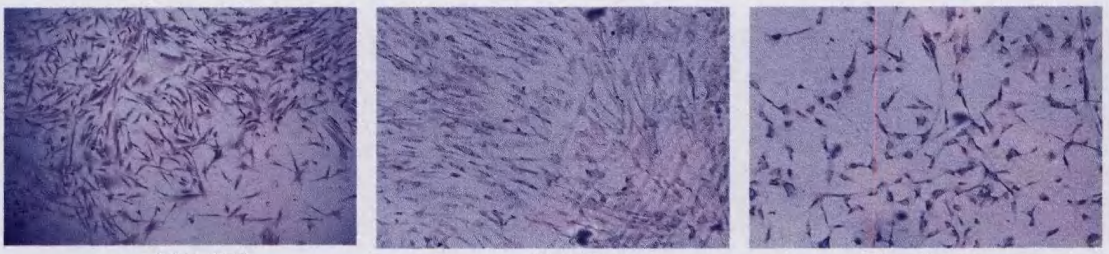
电镜观察显示：标记细胞的细胞核完整，核仁清晰可见，内质网丰富，细胞内可见部分空泡形成，细胞质内可见异常黑色颗粒聚集，散在分布，形状不规则，高密度的铁粒子存在于空泡外（见图 8）。

2.4　标记细胞体外 MRI

标记细胞体外 MRI（见图 9），MR 扫描结果显示各管信号为：未标记的细胞及蒸馏水呈显著高信号，以蒸馏水信号最高，标记细胞信号均明显降低，且随铁浓度增加，信号强度渐进性降低。

3　讨　论

如何有效的标记细胞及细胞标记后的细胞活性研究是细胞移植前的研究重点[7]。据国内外研究结果显示，SPIO 标记细胞的安全浓度范围存在较大差异性，笔者认为这与细胞种类、超顺磁性氧化铁制剂、多聚赖氨酸分子量，以及标记细胞的时间等多方面因素有关。本文试图通过不同浓度 SPIO 标记人成纤维细胞研究其对细胞的磁性标记率和对细胞生长活力的影响。实验结果表明：不同浓度铁标记细胞其标记效率存在差异。细胞对 SPIO 的吸收与标记浓度和孵育时间呈正相关，认为当 SPIO 的 Fe 浓度为 25~50 μg/ml 时，可有效标记细胞且不影响细胞活性；小于 25 μg Fe/ml 的标记浓度虽对细胞活性无影响，但其细胞标记率较低或需延长孵育时间；大于 50 μg Fe/ml 的标记浓度细胞标记率均为 100%，但因细胞内铁含量高，导致部分细胞形态改变、死亡。同时标记时间越长标记率也越高，但时间越长对细胞的损害越大。因此，我们认为自制合成葡聚糖包被的 SPIO-PLL 复合物标



未标记细胞　25 μg Fe/ml　50 μg Fe/ml

100 μg Fe/ml　150 μg Fe/ml　单纯 SPIO

图 1~6　不同浓度铁标记细胞普鲁士蓝染色结果 × 100



铁粒子浓度为 25 μg/ml SPIO 标记细胞后普鲁氏兰染色，证实细胞质内有多少不等的蓝染铁颗粒，大部分铁聚合物包绕在细胞核周围，而细胞核内或细胞外未检测到

图 7　普鲁士蓝染色结果 × 400

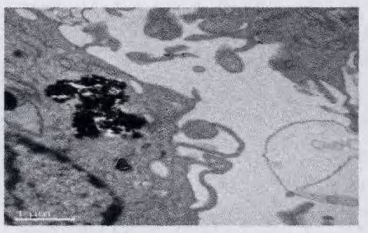


图 8　标记细胞电镜结果 × 15 000



1. 三蒸水管；2. 含铁培养基管；3. 2 × 10^5 个/管未标记细胞管；4. 2 × 10^5 个 / 管标记细胞管（SPIO 浓度为 25 μg/ml）；5. 2 × 10^5 个/管标记细胞管（SPIO 浓度为 50 μg/ml），6. 2 × 10^5 个/管标记细胞管（SPIO 浓度为 100 μg/ml）。

图 9　MRI 结果

表 1 不同浓度铁标记细胞在不同时相的台盼蓝拒染率% (n=10, $\bar{x} \pm s$)

铁浓度	时相				
	第 1 d	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
150 μg/ml	75.24 ± 2.73*#	78.34 ± 2.98*#	79.37 ± 2.78*#	66.12 ± 1.85*#	63.12 ± 3.80*#
100 μg/ml	90.76 ± 1.29	89.99 ± 2.35	87.62 ± 1.14	90.00 ± 1.48	89.99 ± 1.68
50 μg/ml	90.23 ± 1.39	91.00 ± 1.21	91.12 ± 0.82	89.87 ± 1.52	89.87 ± 1.61
25 μg/ml	91.12 ± 1.76	90.49 ± 1.09	89.74 ± 1.73	89.62 ± 1.20	90.24 ± 1.01
对照组	90.25 ± 1.03	89.75 ± 1.77	90.37 ± 1.28	90.75 ± 1.77	90.00 ± 1.96

注：* 与对照组比较，$P<0.001$；# 与组间比较，$P<0.05$

记细胞的安全浓度为 25 ~50 μg Fe/ml 之间，标记时间为 18 ~24 h 标记率高，对标记细胞的功能和生存能力无不利影响，这与国内外大部分研究结果一致[8,9]。

由于细胞膜与 SPIO 颗粒都带有负电荷，两者相互排斥使得氧化铁颗粒很难进入细胞内，标记率低，所以必需对氧化铁颗粒进行适当的修饰，改变其粒子的电性。目前，常采用多聚阳离子转染剂[10]、脂质体[11]、受体介导方式[12]等方法修饰氧化铁共同标记细胞。本实验采用 Arbab 等的方法[13]应用 PLL 介导干细胞磁标记。PLL 是 1 种表面带大量正电荷的转染剂，通过静电荷作用可与表面带负电荷的氧化铁纳米颗粒有效结合，从而增加 SPIO 与细胞的亲和力，以提高细胞的磁标记率。通过实验我们发现，这种 SPIO-PLL 复合物的制备及其后的细胞标记方法简单易行，且标记效率几乎为 100%，普鲁士蓝染色显示大量 Fe_2O_3-PLL 颗粒聚集于细胞质内，而应用未经 PLL 修饰的 SPIO 标记细胞内见少量散在分布的铁颗粒。电镜显示铁粒子位于细胞浆中，且对细胞无毒害作用。

磁共振成像能够很好的显示体外标记细胞信号改变情况，间接反映细胞内的铁浓度。国内外不少研究者采用将细胞重悬于 1% ~ 4% 琼脂糖中进行磁共振扫描，其优点在于消除了磁敏感伪影，图像较清晰，易于统计，但该法受细胞浓度的影响大。在细胞数量较少的情况下会出现假阴性结果。因此，我们尝试只扫描标记细胞，从而避免了假阴性结果的产生。这与我们此次实验结果一致，即使在细胞数少于 10^5 个的情况下，磁共振也能敏感的显示。

总之，本文研究结果表明，运用 SPIO 标记人成纤维细胞是安全、可行的，SPIO 标记细胞的安全浓度为 25~50 μg Fe/ml，最佳标记时间为 18~24 h，且 MRI 能够很好的显示细胞信号强度的变化，对于今后的活体试验研究提供监测保障。本课题下一步将在此研究的基础上移植标记的细胞到 EAE 模型中进行 MRI 观察，并对细胞移植后的功能性分化进行相关研究。

（致谢 本实验得到重庆医科大学附属第一医院放射科文明教授的大力支持，在此表示深深的感谢！）

参 考 文 献

[1] Taupin P, Gage F H. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals(Review)[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(6): 745-749.

[2] Bjorklund L M, Sanchez-Pernaute R, Chung S, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(4): 2344-2349.

[3] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. Science, 1997, 276(5309): 71-74.

[4] Lewin M, Cariesso N, Tung C H, et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(4): 410-414.

[5] 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.

[6] 柏 玮，宋 琳，文 明，等. 超顺磁性氧化铁纳米粒子的制备及性能检测[J]. 重庆医科大学学报，2007，32(9)：922-925.

[7] Aleksandrova M A, Podgornyi O V, Marei M V, et al. Characteristics of human neural stem cells in vitro and after transplantation into rat brain[J]. Bull Exp Biol Med, 2005, 139(1): 114-120.

[8] Song M, Moon W K, Kim Y H, et al. Labeling efficacy of superparamagnetic iron oxide nanoparticles to human neural stem cells: comparison of ferumoxides, monocrystalline iron oxide, cross-linked iron oxide (CLIO)-NH_2 and tat-CLIO[J]. Korean J Radiol, 2007, 8(5): 365-371.

[9] 郑敏文，宦 怡，徐 健，等. 超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞的磁共振成像研究[J]. 中国医学影像技术，2006，22(8)：1129-1134.

[10] Daldrup-link Heike E, Rudelius Martina, Piontek Guido, 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.

[11] 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 lab eling efficiency [J]. Radiology, 2005, 235(1): 155-161.

[12] Kiroher M F, Allport J R, Graves E E, et al. In vivo high resolution threedimensional imaging of antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte trafficking to tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(20): 6838-6846.

[13] 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.

（责任编辑：关蕴良）