技术方法 文章编号:0253-3626(2009)01-0318-04

超顺磁性氧化铁标记大鼠骨髓间充质干细胞的磁共振成像研究

黄铀新，吕富荣，吕发金，肖云华，马秀华，肖智博
（重庆医科大学附属第一医院放射科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨超顺磁性氧化铁纳米粒子（Superparamagnetic iron oxide，SPIO）体外标记大鼠骨髓间充质干细胞（Bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs）的适当浓度和不同标记浓度对细胞的生物学活性影响，以及经 MR 成像的特征等。方法：选取第 5 代细胞进行不同浓度 SPIO 标记，运用光学显微镜观察铁颗粒在细胞内的位置、分布及标记率；选取适当浓度标记量，使用 1.5T 磁共振进行 T_1WI、T_2WI、T_2*WI 扫描，测量不同扫描序列标记细胞管的信号强度改变，并进行统计学分析。结果：标记后的铁颗粒均位于细胞质内；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 24 h 即可有效标记细胞 97%～100%；SPIO 标记的 MSCs 在 T_1WI，T_2WI 及 T_2*WI 序列信号均降低。结论：SPIO 可以简便标记 MSCs。并且在适当浓度下对 MSCs 的生物学活性没有影响，MR T_2WI 和 T_2* WI 序列可有效显像磁性标记的干细胞，为下一步活体试验奠定基础。

【关键词】干细胞；超顺磁性氧化铁；磁共振成像
【中国图书分类法分类号】R329.1；R445.2；R811.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-08

In vitro MR imaging of superparamagnetic iron oxide labeled bone marrow mesenchymal stem cells from SD rat

HANG You-xin, et al
(*Department of Radiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the proper concentration of superparamagnetic iron oxide (SPIO) labeling bone marrow mesechymal stem cells and the biological influence of different labeling concentrations, and to evaluate the characteristics of magnetic resonance imaging by a 1.5 T MR scanner. *Methods*: BMSCs (5^{th}) were incubated with different concentrations of SPIO particles. The location, distribution and the labeling ratio of SPIO particles in cells were observed. At an optimal concentration, samples of SPIO-labeled and unlabeled MSCs suspension in agar were imaged by MRI with T_1WI, T_2WI and T_2*WI. and the signal intensity were measured and statistically analyzed. *Results*: Labeled SPIO particles were stained in cytoplasm. BMSCs were efficiently labeled (97% to 100%) in culture at 24 hours and particle concentrations (25 to 50 μg Fe/ml medium). Compared with unlabeled cells, BMSCs loaded with SPIO had similar viabilitv and proliferation profiles at this proper range of labeling concentration. SPIO labeling caused a stronger low signal attenuation effect in T_1WI、T_2WI andT_2*WI. *Conclusion*: BMSCs can be easily and efficiently labeled by SPIO without interference on the cell viability and proliferation, MRI visualization of SPIO-labeled MSCs is feasible, which provrdes basis for future in vivo studies.

【Key words】Stem cells; Superparamagnetic iron oxid; Magnetic resonance imaging

运用影像技术来监测标记细胞的功能状况是当今医学的前沿课题，由于 MRI 具有较高的分辨率，可以达到单一细胞水平，成为细胞成像研究的热点。超顺磁性氧化铁纳米粒子（Superparamagnetic iron oxide，SPIO）作为一种新型的 MR 对比剂，已经成功的应用于细胞标记领域[1,2]。本文旨在采用 SPIO（商品名 Resovist）进行骨髓间充质干细胞的磁性标记和体外 MR 成像研究，探讨细胞标记的适当浓度，不同浓度对细胞的生物活性影响以及 MR 成像特点，为下一步的活体试验奠定基础。

作者介绍：黄铀新（1979- ），男，住院医师，硕士，
研究方向：分子影像学，神经影像学。
通讯作者：吕富荣，男，副教授，E-mail：lfr918@sina.com。
基金项目：重庆科委自然科学基金项目（CSTC2007BB5292）。

1 材料与方法

1.1 细胞株

SD 大鼠骨髓间充质干细胞（Bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs）细胞株购自赛业（广州）生物科技有限公司。其流式检测报告显示：CD29(+)、CD44(+)、CD45(-)。

1.2 实验试剂及仪器

Resovist（德国 Schering 公司惠赠）：1.4 ml/ 支，含铁浓度 0.5 mg/ml，铁颗粒直径 50 nm。多聚赖氨酸（PLL）（美国 Gibco 公司），胎牛血清（杭州四季青公司）。细胞培养基 DMEM/F12、胰蛋白酶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基础研究所提供。GE1.5T 磁共振。

1.3 不同标记浓度的比较

将 Resovist 按照 25、50、100、150、200 μg/ml 与等容积的 PLL（1.5 μg/ml）混入含 0.2 胎牛血清的培养基内，置于 37℃ 涡旋振荡仪中孵育 60 min 合成 SPIO-PLL 复合物。将 SPIO-PLL 复合物加入含 1×10^5 个 / 孔细胞的 12 孔板中，Resovist 终浓度分别为 12.5、25、50、75、100 μg/ml，PLL 终浓度为 0.75 μg/ml。并依次设置试验组 B-F 组，A 组为对照组，未加 SPIO-PLL 复合物，每组 2 孔。将 24 孔板置于 5%CO_2 培养箱中孵育 24 h 后，每组分别采用普鲁士蓝染色法检测细胞铁分布和台盼蓝排除试验检测细胞活性。

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 3 次，进行普鲁士蓝染色：1%戊二醛固定 10 min，PBS 液洗涤 3 次，2%亚铁氰化钾 -6%盐酸水溶液孵育 30 min，PBS 液洗涤 3 次，应用光学显微镜对各个样本分别摄像，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%。

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 = 染色阴性细胞数 /100 个细胞 × 100%。以未标记细胞作对照。

1.4 细胞团法标记细胞 MR 体外成像

根据上述细胞标记细胞浓度检测结果分析后，我们以 25 μgFe/ml 培养液浓度标记 BMSCs，24 h 后消化提取细胞，按照不同细胞数分置于 0.2 ml Ependoff 管中，静置 1 h，细胞沉积于 Ependoff 管底部，置入水盒内进行 MR 扫描。

成像分组：1 管 - 三蒸水管，2 管 - 培养基管，3 管 -2×10^5 个/管未标记细胞管，4 管 -2×10^5 个/管标记细胞管，5 管 -1×10^5 个/管标记细胞管，6 管 -5×10^4 个/管标记细胞管。

磁共振成像序列及方法：用 GE Signa 1.5T MR 磁共振成像系统。用 3 英寸线圈，常规行冠状位和横断位 T_1WI，T_2WI 及 T_2*WI 成像，具体参数：T_1WI：TR=300 ms，TE=Minimum；T_2WI：TR=3 600 ms，TE=102 ms；T_2*WI：TE=Min Full. 层厚 2 mm，层间隔 Omm，矩阵 256 × 256，FOV 为 120 mm × 90 mm。NEX-4。

比较不同序列上标记细胞与未标记细胞的信号强度变化情况。计算信号强度变化率的公式为：[(L-U)/U] × 100%。L 为标记细胞，U 为未标记细胞[3]。

1.5 统计分析

对测量结果采用 SPSS12.0 统计分析软件进行统计学处理，计数资料采用均数与标准差（$\bar{x}\pm s$）。

2 结 果

2.1 Resovist 标记 MSCs 的普鲁士蓝染色

普鲁士蓝染色阳性标记 MSCs 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，染色的深浅程度与所加的 Resovist 的剂量成正相关（图 1）。B 组（12.5 μg Fe/ml）标记率为 75%，C 组（25 μg Fe/ml）标记率为 97%，D~F 组（50~100 μg Fe/ml）标记率均为 100%。

2.2 Resovist 标记 MSCs 的台盼蓝染色

B~F 组细胞台盼蓝据染率分别为 100%、100%、98%、90%、85%。随着 Resovist 浓度的升高，细胞出现少许溶解征象。以 F 组（100 μg Fe/ml）最为明显。

2.3 标记细胞 MR 体外成像

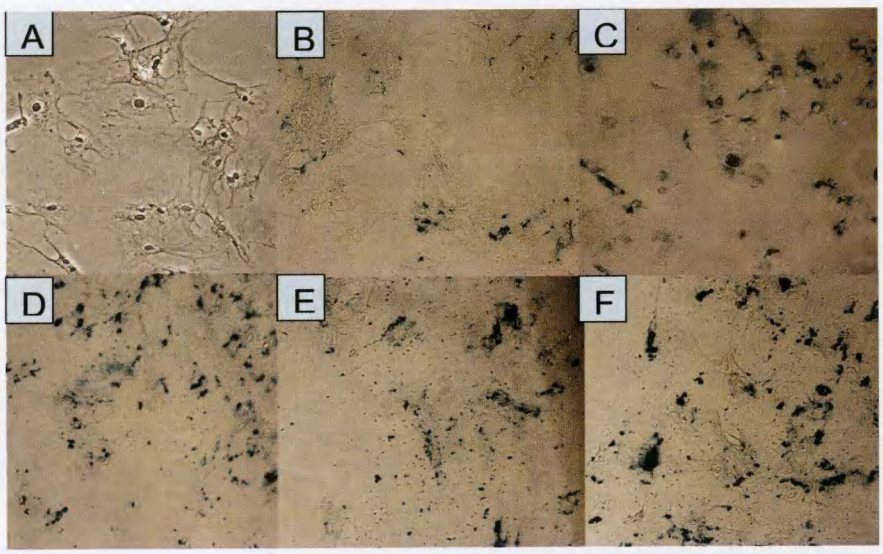
标记细胞 MR 体外成像见图 2，T_1WI，T_2WI 及 T_2*WI 序列冠状位图像各管底部信号改变值见表 1。

对 3 个序列中标记细胞和未标记细胞信号强度变化计算的结果显示：在 T_1WI，T_2WI，T_2*WI 序列中，标记细胞团信号强度较未标记细胞团均有明显下降，尤以 T_2* 信号强度减低最明显。经计算 2×10^5 个/管 T_1WI，T_2WI，T_2*WI 信号强度变化率分别为 -41.18%、-54.13%、-78.78%。

3 讨 论

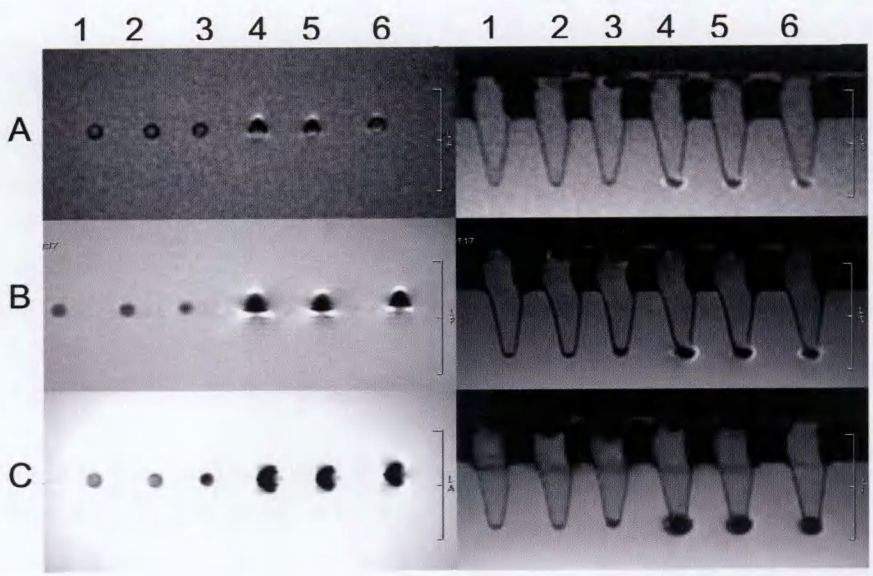
表 1 T_1WI，T_2WI 及 T_2*WI 序列冠状位图像各管底部信号改变值

成像序列	三蒸水	培养基	未标记细胞 2×10^5 个 / 管	标记细胞 2×10^5 个 / 管	标记细胞 1×10^5 个 / 管	标记细胞管 5×10^4 个 / 管
T_1WI	167.27 ± 9.57	154.86 ± 7.00	148.47 ± 27.70	87.33 ± 60.18	103.47 ± 59.36	123.31 ± 53.73
T_2WI	852.94 ± 51.82	812.81 ± 86.75	198.40 ± 76.64	91.00 ± 53.72	100.68 ± 83.02	175.67 ± 57.23
T_2*WI	209.00 ± 10.03	202.60 ± 8.53	70.69 ± 8.95	15.00 ± 10.11	18.50 ± 12.16	30.42 ± 8.58



从 A~F 分别为：未标记细胞、12.5、25、50、75、100 μg/ml（Resovist）

图 1　不同浓度铁标记细胞普鲁士蓝染色染色结果（×40）



1 管－三蒸水管；2 管－培养基管；3 管－2×10^5 个/管未标记细胞管；4 管－2×10^5 个/管标记细胞管；5 管－1×10^5 个/管标记细胞管；6 管－5×10^4 个/管标记细胞管

A、B、C 分别为 T_1WI，T_2WI 及 T_2*WI 序列横断位、冠状位图像，从图可见各标记细胞管底部细胞聚集区信号强度均有不同程度下降，且随着细胞数量的增多，底部低信号细胞团有增大趋势

图 2　各管细胞磁共振扫描结果

干细胞移植作为临床疾病的一种治疗手段已成为可能[4]，但如何监测干细胞移植后的分布和归宿成为一个难点。目前细胞标记的方法很多，例如抗原标记、荧光标记、核素标记等等。这些方法在检测时是具有侵袭性的，需要制作成组织切片。随着分子影像学的发展，活体追踪干细胞成为可能。MR 具有高分辨率的特点，成为活体追踪干细胞的最佳技术手段。

然而，常规 MR 无法显示移植细胞和细胞作用的靶细胞或靶器官。超顺磁性氧化铁 SPIO 作为负性标记物，广泛应用于细胞标记和 MR 示踪的研究中。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[5]。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、多聚赖氨酸分子量有关。本文尝试通过不同浓度 Resovist 标记 BMSCs 研究其对细胞活性的影响，认为 25~50 μg Fe/ml 的标记浓度不影响细胞活性；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；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，导致部分细胞死亡。因此，我们认为 SPIO 标记细胞的安全浓度为 25~50 μg Fe/ml 之间。

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[6]、脂质体[7]、受体介导方式[8]等方法修饰氧化铁共同标记细胞。本文采用多聚阳离子转染剂多聚赖氨酸 PLL 包埋 SPIO 颗粒，使带负电荷的细胞膜通过非特异性吸收过程摄取 SPIO 颗粒。这种 SPIO-PLL 复合物的制备及其后的细胞标记方法简单易行，且标记效率高，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。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[9~12]，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。这与我们后期的动物实验结果一致，即使在细胞数少于 10^3 个的情况下，磁共振也能敏感的显示。

超顺磁性氧化铁早期用于肝、脾、淋巴结中的巨噬细胞成像，近年来发展到运用各种细胞成像，如干细胞、免疫细胞、肿瘤细胞等。BMSC 具有向多种支持或基质细胞分化的能力，所以是用于细胞治疗的一种常用细胞[13]。采用 SPIO 标记 BMSC 是为了更好在活体试验中监测其动态空间分布情况。这也是本文的主要研究目的。

总之，本文研究结果表明，运用 SPIO 标记 BMSC 是安全可行的，SPIO 标记细胞的安全浓度为 25~50 μg Fe/ml，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。

参 考 文 献

[1] Hauger O, Frost E E, Heeswijk R V, et al. MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy[J]. Radiology, 2006, 238: 200-210.

[2,6] Heike D 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: 197-205.

[3,12] Frank J A, Miller B R, Arbab A S, et al. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents[J]. Radiology, 2003, 228: 480-487.

[4] 景 猛，刘新权，梁 鹏，等. 纳米铁粒子标记人骨髓基质细胞及移植后 MRI 示踪的临床研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志，2007, 6(1): 35-38.

[5] 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): 114-20.

[7] 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: 155-162.

[8] 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: 6838-6845.

[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] 李 祥，漆剑频，朱文珍，等. 体外磁共振成像对神经干细胞标记后驰豫活性得试验研究[J]. 放射学实践，2006, 21(2): 114-117.

[11] 金旭红，杨 柳，段小军，等. 体外纳米磁带标注骨髓间充质干细胞生特学特性及其 MR 成像[J]. 第三军医大学学报，2008, 30(4): 275-279.

[12] Song M, Moon W K, Kin Y, 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: 365-371.

[13] Neri M, Maderna, Cavazzin C, et al. Efficient in vitro labeling of human neural precursor cells with superparagnetic iron oxide particles: relevance for in vivo cell tracking[J]. Stem Cell, 2008, 26: 505-516.

（责任编辑：冉明会）