

磁性标记的小胶质细胞在大鼠脑内的 MR 示踪

宋阳 薛一雪 朱丽娜 刘云会

【摘要】 目的 探讨超顺磁性氧化铁颗粒(SPIO)标记的小胶质细胞在正常大鼠及阿尔茨海默病(AD)大鼠体内移植后,MR活体示踪的可行性。方法 以日本血液凝集病毒包膜(HVJ-E)为标记载体,将SPIO标记的小胶质细胞经颈内动脉注入正常大鼠(5只)及AD大鼠动物模型(5只)体内,3d后应用7.0T MR行 T_2^* 序列扫描,并与脑组织切片组织化学染色结果对照。结果 在正常大鼠脑内,MRI可见数个点状的信号改变区,这些信号改变区散在地分布在脑内各处,脑组织切片显示铁颗粒标记细胞位置与信号改变部位一致。MRI能够检测到由数个标记细胞引起的信号强度的改变。在AD大鼠模型脑内,MRI可见 β -淀粉样蛋白42(A β 42)注射区信号强度明显下降,信号改变区面积较大。与之相比,生理盐水注射区信号改变的强度及面积均不如A β 42注射区改变明显。A β 42注射区的标记细胞数为(454 \pm 47)个/mm²,明显高于生理盐水注射区的标记细胞数(83 \pm 13)个/mm²($P < 0.05$)。结论 MRI可作为一种非侵入性检测手段在活的动物体内追踪标记细胞,在AD细胞水平的治疗中具有一定临床应用前景。

【关键词】 小胶质细胞; 阿尔茨海默病; 磁共振成像; 大鼠

Magnetic resonance tracking of transplanted microglia labeled with superparamagnetic iron oxide particles in the brain of normal rat and Alzheimer's disease model rat SONG Yang*, XUE Yi-xue, ZHU Li-na, LIU Yun-hui. * Experimental Center of the Functional Subjects, China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: XUE Yi-xue, Email: xueyixue888@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the methods of labeling exogenous microglia with superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles, and to monitor the labeled cells after transplantation into the normal rat and Alzheimer's disease (AD) model rat with MR scanning. Methods Microglia was labeled with SPIO particles by using transfection agent, hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E). Then the microglia which were labeled with SPIO were injected into the internal carotid artery of normal rat ($n = 5$) and AD model rat ($n = 5$). Three days after transplantation, follow-up serial T_2^* -weighted gradient-echo MR imaging was performed at 7.0T MRI system. MR images were correlated with histological findings. Results In the brain of normal rat, the labeled microglia were demonstrated as several dotty signal intensity decrease on T_2^* -weighted MR images. The dotty spots were sporadic around the brain. Histological analysis showed that most prussian blue staining-positive cells were well correlated with the area where a signal intensity decrease was observed in MRI. MR could detect the signal intensity change caused by a few labeled cells. In the brain of AD model rat, MR scan showed a well-defined hypointensity area in the region of A β 42 injection. Signal intensity decrease was not obvious in the region of saline injection. The number of iron-positive cells (454 \pm 47)/mm² at sites of A β 42 injection was much higher than that (83 \pm 13)/mm² of saline injection ($P < 0.05$). Conclusion MR can be used as a non-invasive means of detecting transplanted labeled microglia in vivo, with the potential for future clinical application in cell therapy of AD.

【Key words】 Microglia; Alzheimer disease; Magnetic resonance imaging; Rats

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570650、30670723)

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学机能实验中心(宋阳、朱丽娜),神经生物学教研室(薛一雪);中国医科大学附属盛京医院神经外科(刘云会)

通信作者:薛一雪,Email: xueyixue888@yahoo.com.cn

近年来,细胞移植治疗退行性神经系统疾病的研究日趋深入,传统移植细胞的示踪方法是动物处死后行组织切片观察,随着超顺磁性MR显像剂的研制成功及其在细胞标记方面取得的快速进展,MR示踪技术被逐渐用于细胞移植后在活体内无创性观

察移植细胞的分布及生存状态^[1-3]。

最近有研究发现一种新的非病毒载体系统,即日本血液凝集病毒包膜(HVJ-E),利用 HVJ-E 的膜融合特性可有效地将超顺磁性氧化铁颗粒(SPIO)整合入目的细胞^[4-5]。本实验以 HVJ-E 作为载体,将 SPIO 标记的小胶质细胞,经颈内动脉移植入正常大鼠及阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)大鼠模型后,观察移植细胞能否在 7.0 T MR 扫描图像中示踪,为 AD 的细胞治疗提供可能的活体检测手段。

资料与方法

1. 细胞培养和标记:小鼠小胶质细胞系(EOC 13.31, ATCC, 美国)在含有 10% 胎牛血清、20% Ladmac 上清液和 1% 青霉素和链霉素混合物的 Dulbecco 改良的 Eagle 基质中培养。以 HVJ-E 为载体,用 SPIO 标记小胶质细胞^[4]。

2. 大鼠 AD 模型的建立:健康雄性 Wistar 大鼠,6~8 个月龄,体重 260~300 g(滋贺医科大学实验动物中心提供),腹腔注射苯巴比妥钠(50 mg/kg, IP)麻醉,并固定在立体定位仪上。给予 α -淀粉样蛋白 42(A 42)前,笔者将冻干人 A 42(滋贺医科大学中心研究实验室合成)溶于 10 mmol/L 磷酸缓冲盐溶液(PBS, pH 7.4)中。用前孵育 A 42 以获得在人 AD 的老年斑中可见的聚集态,具体操作方法见参考文献[6],将 A 42 注射入大鼠海马回中。注射点在距离冠状缝与矢状缝交点 Bregma 后 3.5 mm,中线旁 2.0 mm(左侧),进针深度为 3.5 mm。对侧注射同样体积的生理盐水。注射流率为 1.0 μ l/min,注射后钢针在原位再停留 5 min 后拔出。缝合切口, A 42 注射后 3 d,通过大鼠颈内动脉给予外源性小胶质细胞。

3. 颈动脉注射小胶质细胞:取正常大鼠和 AD 模型大鼠各 5 只,将 SPIO 标记的小胶质细胞,收集在一个 12 ml 的试管中,在离心力 200 g 的情况下离心 2 min。加入 10 mmol/L PBS 混匀,使细胞最终浓度约为 6×10^6 个/ml。将大鼠麻醉,切开颈部皮肤,暴露颈动脉鞘。将 0.5 ml PBS 中的 3×10^6 个细胞在 >30 s 的时间里随机经左侧或右侧颈内动脉注入大鼠体内。

4. MRI:外源性小胶质细胞注射后 3 d,采用 Inova(Varian, 美国)MR 扫描仪,在 7.0 T 场强行 T_2^* 回波序列扫描,采集大鼠脑部俯卧位轴面及冠状面 MR 影像。相关参数为 TR 180 ms、TE 25 ms、倾斜角 40°、视野 60 mm \times 60 mm、扫描层厚 1 mm、

矩阵 256 \times 256。在 MR 扫描过程中,大鼠用含有 1.5% 异氟烷的 50% O₂ 与 50% N₂ 混合气麻醉,保持自主呼吸。

5. 组织处理:获取 MR 影像后,大鼠用苯巴比妥钠(70 mg/kg)深度麻醉,先后用 300 ml 10 mmol/L PBS 及 300 ml 冰冷的 4% 多聚甲醛经主动脉灌注。灌注固定后,大鼠置冰内 30 min,然后用 1000 ml 含 15% 蔗糖的 0.1 mol/L PBS 继续灌注。脑组织于低温保持器中切成 20 μ m 厚的切片。

6. 铁颗粒阳性细胞定量:每只大鼠取 3 张海马切片(20 μ m)在显微镜(Olympus IX50/IX70, 日本)下观察。计数双侧整个海马区的阳性细胞,数据转换为每平方毫米标记细胞的个数。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学分析采用 SPSS 11.5 统计软件,行 Student s-t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

7. 铁颗粒染色:将切片置于含 1% 氰亚铁酸钾的 1% 盐酸溶液中在室温下反应 30 min,使铁离子呈现蓝色(普鲁士蓝染色)。

结 果

1. 正常大鼠脑内 MR 示踪标记小胶质细胞的分布:MR 扫描所得到的 T_2^* WI 显示正常大鼠脑内有一些暗点(图 1~3)。从大鼠脑组织冠状面的 MRI 上看,这些暗点遍及大鼠脑内各处。

2. 正常大鼠脑内标记细胞 MRI 与组织化学染色的比较结果:将大鼠脑组织的 MRI(图 4, 5)分别与普鲁士蓝染色结果(图 6, 7)相比较,显示 SPIO 标记的小胶质细胞的组织化学染色结果与 MR 影像位于相同的位置。小胶质细胞内 SPIO 引起的 MR 信号改变区域的面积比普鲁士蓝染色方法所呈现的小胶质细胞所在区域的面积大。位于每一暗点处的 SPIO 标记的小胶质细胞的数量很少。在一系列连续的组织切片上计数,能够引起 MRI 信号改变的 SPIO-标记小胶质细胞的数量约为 2~5 个。亦有单个的 SPIO-标记的小胶质细胞可通过组织化学方法观察到,但未引起 MRI 信号的改变。

3. AD 模型大鼠脑内标记细胞 MRI 与组织化学染色的比较结果: MRI 显示, AD 大鼠脑内 A 42 注射区由于含 SPIO 的小胶质细胞的聚集,引起了清晰的信号改变(图 8)。在左侧海马内可见一明显暗区,而右侧生理盐水注射区则几乎未见 MRI 信号的改变。组织切片普鲁士蓝染色,可见 A 42 注射区有少数蓝染的阳性细胞,而生理盐水注射区则少见阳性细胞(图 9)。计数双侧海马区阳性细胞显示,

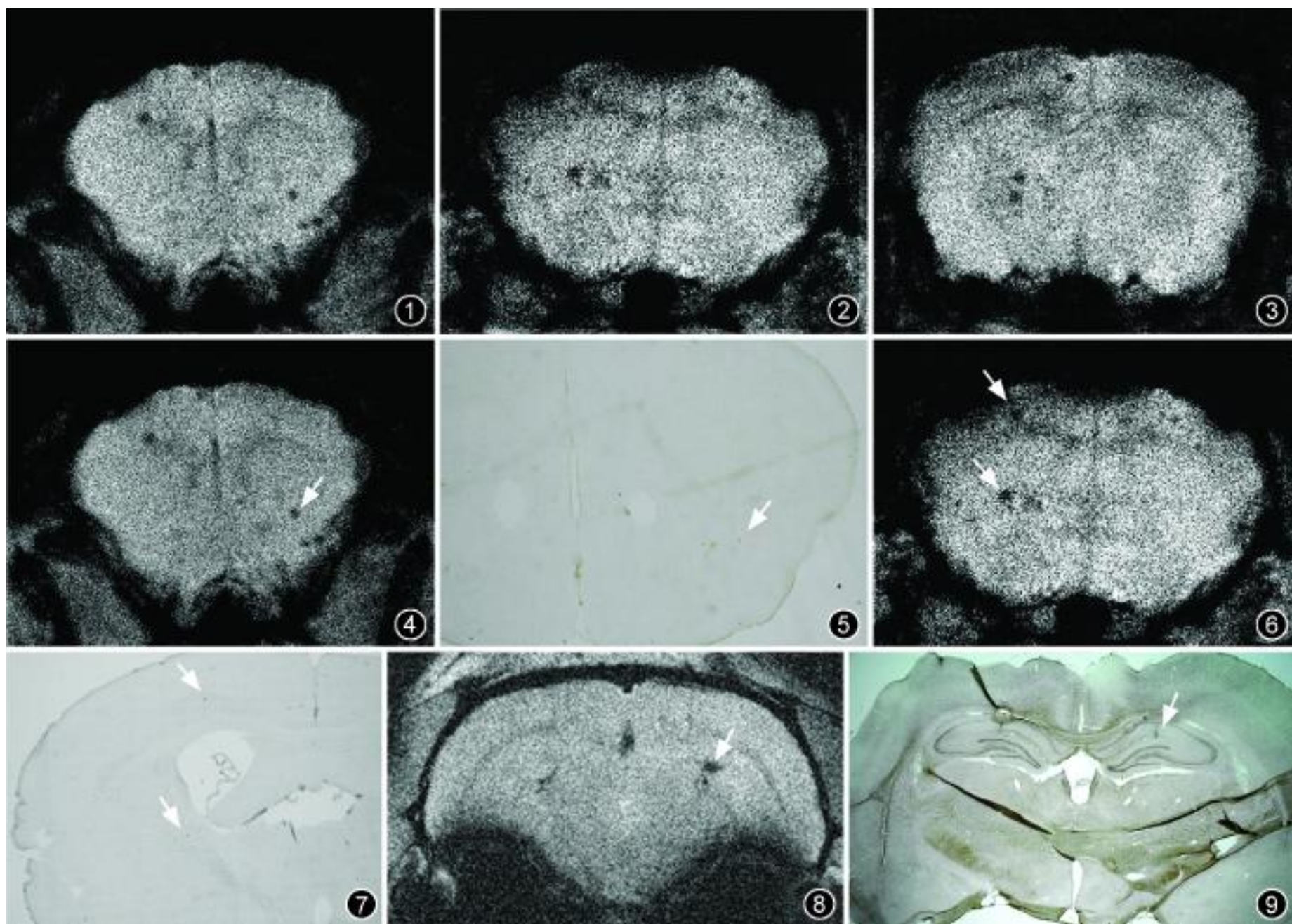


图 1 ~3 示正常大鼠脑组织冠状面不同层面上超顺磁氧化铁颗粒 (SPIO) 标记的小胶质细胞 MRI, 标记细胞中 SPIO 引起周围大鼠脑组织信号强度减弱, 在大鼠脑内呈一些分散的暗点 图 4, 5 示正常大鼠脑内标记细胞的 MR 影像, 标记细胞中 SPIO 引起周围大鼠脑组织 MRI 信号强度减弱, 形成暗点 (箭) 图 6, 7 示 MR 成像相应部位大鼠脑组织切片普鲁士蓝染色结果 ($\times 4$)。标记细胞中铁离子经普鲁士蓝染色呈现蓝色 (箭)。将图 4, 5 分别与图 6, 7 相比较, MR 影像中暗点与普鲁士蓝染色中蓝染细胞位于相同的位置 图 8 示 AD 大鼠模型脑内标记细胞的 MR 影像, A 42 注射区有清晰的 MRI 信号改变 (箭); 对侧生理盐水注射区 MRI 信号改变不明显 图 9 示普鲁士蓝染色结果 ($\times 2$)。A 42 注射区可见大量蓝染的小胶质细胞聚集 (箭), 而生理盐水注射区则少见阳性细胞

A 42 注射侧的阳性细胞数 (454 ± 47) 个/ mm^2 明显高于生理盐水注射侧的阳性细胞数 (83 ± 13) 个/ mm^2 ($t=7.744$, $P < 0.05$)。

讨 论

1. MR 示踪及细胞标记: 应用细胞移植治疗中枢神经系统疾病过程中, 能够采用非侵入性方法活体实时监测移植细胞在中枢神经系统内的分布、迁移和生长代谢, 对评估移植细胞的作用和疗效具有重要意义。在实验中, 笔者以 HVJ-E 为载体, 将 SPIO 整合入小胶质细胞。HVJ-E 载体不带电荷, 它利用膜的融合特性将基因转入细胞, 转染效率高^[7-8]。虽然笔者发现了单个的 SPIO 标记的小胶质细胞没有引起 MR 信号的改变, 但平均起来, 在每一处 MR 扫描的暗点处可以发现 2 ~5 个含有 SPIO 的小胶质细胞。这种标记方法的高敏感性使我们能

够利用 MRI 在小鼠脑内发现较低数量的细胞。

2. AD 模型: 虽然到目前为止, 人们对于 AD 的发病机制还不甚清楚, 但大多数学者认为 A 42 沉积是所有因素导致 AD 的共同途径。A 42 的神经毒性作用已经被公认是 AD 形成和发展的关键因素^[9]。海马是大脑学习记忆的关键部分, A 42 沉积在新皮质、海马等区显著, 且海马具有高度有序化的板层结构, 各种神经组织相对独立分布, 能为脑功能的结构提供直观而简洁的形态学效果, 故选用海马定位给药是较为理想的途径。本研究即采用聚集态的 A 42 海马内急性注射, 复制 AD 的大鼠动物模型。然后经大鼠颈动脉注射由 SPIO 标记的小胶质细胞, MRI 清楚地检测到小胶质细胞聚集在 A 42 沉积物周围。

3. 小胶质细胞与脑病: 中枢神经系统发生病理改变时可激活小胶质细胞。体内小胶质细胞在脑实

质先天防御感染、缺血、创伤、脑肿瘤和神经退行性病变中起到关键作用。在 AD 患者脑中, 内源性小胶质细胞明显聚集在 β -淀粉样蛋白周围, 具有吞噬 β -淀粉样蛋白肽和参与炎症反应的功能。那么外源性小胶质细胞是否可以通过血脑屏障进入脑组织, 在 AD 的细胞治疗方面起到一定的作用?

本研究采用 7.0 T MR 扫描仪, 在移植小胶质细胞后获取了正常大鼠脑组织的 MRI, 清楚地显示大鼠脑内存在一些暗点。普鲁士蓝染色证明 MR 影像中的暗点是由于该处细胞内的铁离子引起了 MRI 信号的改变。因此, 外源性给予的小胶质细胞可通过完整的血脑屏障进入大鼠脑组织。进一步观察移植小胶质细胞在 AD 模型大鼠脑内的分布, MR 扫描及组织化学染色结果显示, 进入脑组织内的小胶质细胞不是散在分布, 而是聚集在 A β 42 沉积物周围。最近有文献报道, 小胶质细胞可通过特异性^[10]和非特异性^[11] 2 种机制吞噬 β -淀粉样蛋白肽。因此, 移植小胶质细胞可能对 AD 具有一定的治疗潜能, 但另一方面, 它们也可以产生一些不良的影响^[12-13]。有文献报道, 老年斑周围活化的小胶质细胞可能直接引起 AD 的病理改变或加重已有的病情。另外, 根据超微结构的观察, 一些研究者最近提出, 小胶质细胞实际上分泌甚至合成 A β 42。为了确定小胶质细胞和巨噬细胞在治疗 AD 方面的作用, 则需要进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Allport JR, Weissleder R. In vivo imaging of gene and cell therapies (Review). *Exp Hematol*, 2001, 29: 1237-1246.
- [2] Bulte JW, Duncan ID, Frank JA. In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation

(Review). *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22: 899-907.

- [3] Heckl S, Pipkom R, N gele T, et al. Molecular imaging: bridging the gap between neuroradiology and neurohistology (Review). *Histol Histopathol*, 2004, 19: 651-668.
- [4] Toyoda K, Tooyama I, Kato M, et al. Effective magnetic labeling of transplanted cells with HVJ-E for magnetic resonance imaging. *Neuroreport*, 2004, 15: 589-593.
- [5] Miyoshi S, Flexman JA, Cross DJ, et al. Transfection of neuroprogenitor cells with iron nanoparticles for magnetic resonance imaging tracking: cell viability, differentiation, and intracellular localization. *Mol Imaging Biol*, 2005, 7: 286-295.
- [6] Takata K, Kitamura Y, Tsuchiya D, et al. Heat shock protein-90-induced microglial clearance of exogenous amyloid-beta1-42 in rat hippocampus in vivo. *Neurosci Lett*, 2003, 344: 87-90.
- [7] Bulte JW, Douglas T, Witwer B, et al. Monitoring stem cell therapy in vivo using magnetodendrimers as a new class of cellular MR contrast agents. *Acad Radiol*, 2002, 9 (Suppl 2): S332-S335.
- [8] Hoehn M, Küstermann E, Blunk J, et al. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 16267-16272.
- [9] Pereira C, Agostinho P, Moreira PI, et al. Alzheimer s disease-associated neurotoxic mechanisms and neuroprotective strategies (Review). *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2005, 4: 383-403.
- [10] Bard F, Cannon C, Barbour R, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer s disease. *Nat Med*, 2000, 6: 916-919.
- [11] Akiyama H, McGeer PL. Specificity of mechanisms for plaque removal after a beta immunotherapy for Alzheimer disease. *Nat Med*, 2004, 10: 117-118.
- [12] McGeer PL, McGeer EG. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease (Review). *Neurobiol Aging*, 2001, 22: 799-809.
- [13] Schenk DB, Yednock T. The role of microglia in Alzheimer s disease: friend or foe (Review)? *Neurobiol Aging*, 2002, 23: 677-679.

(收稿日期: 2007-06-25)

(本文编辑: 张琳琳)