

# 大鼠骨髓间充质干细胞的钆-荧光双标记及 MRI 体外示踪的研究

沈君 周翠屏 成丽娜 段小慧 毕小斌 刘宇 符岳 梁碧玲 邓宇斌

**【摘要】** 目的 应用多聚胺载体,对大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)进行钆喷替酸葡甲胺(Gd-DTPA)及荧光双标记,探讨 MSCs MR 磁性标记及体外示踪的可行性。方法 以聚乙烯亚胺-罗丹明复合物(JetPEI-FluoR)为载体,制备 Gd-DTPA 双标记示踪剂,培养分离 SD 大鼠骨髓 MSCs,以此示踪剂体外标记间 MSCs。对标记后细胞行生物学性状检测及电镜、荧光镜观察。应用 1.5 T MR 仪,对标记的干细胞进行 SE T<sub>1</sub> WI 及 T<sub>2</sub> WI 及混合(mixed)回波序列的 T<sub>1</sub> 测量,标记细胞正常传代后进行 MR 检查,观察标记的持久性。标记细胞、未标记细胞的 T<sub>1</sub> WI 信号强度、T<sub>1</sub> 之间的比较使用 t 检验,台盼蓝拒染率采用两因素重复资料方差分析,不同浓度示踪剂下细胞吸光度比较采用单因素方差分析。结果 双标记示踪剂标记 5×10<sup>5</sup> 个 MSCs,标记成功了 4.25×10<sup>5</sup> 个,荧光镜下标记率为 85%,电镜下钆(Gd)颗粒主要位于胞质内高尔基体周围。双标记示踪剂孵育 3、6、12、24 h 内标记细胞的台盼蓝拒染率分别为(96.55 ±2.90)%、(94.17 ±2.56)%、(97.16 ±3.12)%、(94.23 ±2.67)%,相应的未标记细胞的拒染率分别为(95.86 ±2.67)%、(92.04 ±2.21)%、(93.38 ±3.64)%、(92.12 ±2.53)%,24 h 内标记细胞与未标记细胞拒染率差异无统计学意义(F=4.523, P>0.05)。细胞增殖实验中,在 2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0 μl 不同浓度示踪剂时,标记细胞的吸光度分别为(0.1884 ±0.0151)、(0.1878 ±0.0190)、(0.1741 ±0.0160)、(0.1135 ±0.0215)、(0.1079 ±0.0145)、(0.0811 ±0.0079),未标记细胞为(0.1940 ±0.0116),Gd-DTPA 30.0 μl 以下标记细胞与未标记细胞吸光度差异无统计学意义(q=0.2225~0.9458, P>0.05)。标记后细胞凋亡指数为 5.08%,对照组未标记细胞为 3.86%。未标记细胞 T<sub>1</sub> WI 平均信号强度及 T<sub>1</sub> 分别为 240.3 ±24.7、(2457 ±56) ms,而标记细胞为 336.2 ±20.7、(1102 ±64) ms,两者间差异有统计学意义(t 值分别为 12.656、17.889, P 值均 <0.01),T<sub>1</sub> WI 可监测到最低密度为 5×10<sup>3</sup> 个标记细胞。标记细胞正常传代后, MRI 体外可持续显示至第 4 代标记细胞。结论 应用多聚胺载体对大鼠间充质干细胞进行 Gd-DTPA 及荧光双标记,安全有效, MRI 能示踪体外双标记的干细胞。

**【关键词】** 干细胞; 磁共振成像; 动物, 实验

Gadolinium and fluorescent bi-functionally labeling and in vitro MRI of rat bone marrow mesenchymal stem cells SHEN Jun\*, ZHOU Cui-ping, CHENG Li-na, DUAN Xiao-hui, BI Xiao-bin, LIU Yu, FU Yue, LIANG Bi-ling, DENG Yu-bin. \* Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China

**【Abstract】** Objective To determine the feasibility of magnetically labeling and tracking mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro by using a gadolinium and fluorescent bi-functionally transfection agent of polyethylenimine. Methods A gadolinium bifunctional transfection reagent complex was obtained after the linear polyethylenimine derivative (JetPEI-FluoR) was incubated with Gd-DTPA. Mesenchymal stem cells isolated from the bone marrows of SD rats were cultured and expanded. The mesenchymal stem cells were incubated with the bi-functional labeling agents. After labeling, the MSCs were examined with fluoroscope and electron microscope and the biological characters were detected including trypan blue exclusion test, MTT, and apoptosis detection. On a 1.5 T MR system, the labeled MSCs were examined with spin echo T<sub>1</sub> WI and T<sub>2</sub> WI and T<sub>1</sub> measurement with mixed sequence. After labeling, the cells were cultured and undergone routine passage. Prior MR examinations were repeated for each passage of labeled

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400115);广东省自然科学基金资助项目(04300241)

作者单位:510120 广州,中山大学附属第二医院放射科(沈君、周翠屏、成丽娜、段小慧、梁碧玲),急诊科(符岳);中山大学基础医学院病理生理教研室(毕小斌、刘宇、邓宇斌)

cells. All data was statistically processed with SPSS for Windows. Results Of  $5 \times 10^5$  MSCs incubated with the bi-functional agents,  $4.25 \times 10^5$  MSCs were successfully labeled, the percentage of labeled MSCs was 85% fluoroscopically. The high density electron particles of gadolinium observed electron microscopically existed around cellular apparatuses, especially around Golgi apparatus. In trypan blue exclusion test, the exclusion rate of labeled MSCs with incubation duration of 3, 6, 12, 24 h was  $(96.55 \pm 2.90) \%$ ,  $(94.17 \pm 2.56) \%$ ,  $(97.16 \pm 3.12) \%$  and  $(94.23 \pm 2.67) \%$ , respectively. The corresponding exclusion rate of unlabeled MSCs was  $(95.86 \pm 2.67) \%$ ,  $(92.04 \pm 2.21) \%$ ,  $(93.38 \pm 3.64) \%$  and  $(92.12 \pm 2.53) \%$ , respectively. There was no statistical difference of trypan blue exclusion rate between labeled cells and control unlabeled cells within 24 hours of incubation ( $F = 4.523$ ,  $P > 0.05$ ). In the proliferation test, the optical absorption value of labeled MSC with 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 and 40.0  $\mu\text{l}$  bi-functional labeling agent was  $(0.1884 \pm 0.0151)$ ,  $(0.1878 \pm 0.0190)$ ,  $(0.1741 \pm 0.0160)$ ,  $(0.1135 \pm 0.0215)$ ,  $(0.1079 \pm 0.0145)$  and  $(0.0811 \pm 0.0079)$ , respectively. The corresponding optical absorption value of unlabeled MSCs was  $(0.1940 \pm 0.0116)$ . The optical absorption value of labeled cells was not affected in case of less than 30.0  $\mu\text{l}$  of Gd-DTPA ( $q = 0.2225 - 0.9458$ ,  $P > 0.05$ ). The apoptosis index for labeled cells and unlabeled cells were 5.08% and 3.86%, respectively. On  $T_1$ WI, the signal intensity and  $T_1$  relaxation time of unlabeled cells and labeled cells were  $240.3 \pm 24.7$  and  $(2457 \pm 56)$  ms,  $336.2 \pm 20.7$  and  $(1102 \pm 64)$  ms, respectively, and there were significant statistical difference ( $t = 12.656$ ,  $17.889$ ,  $P < 0.01$ ). The minimal amount of cells which was detectable for  $T_1$ WI was  $5 \times 10^3$ . After routine passage, the gadolinium in the cells gradually decreased and could be tracked by MRI until the fifth passage. Conclusions The gadolinium and fluorescent bi-functionally labeling rat bone marrow mesenchymal stem cell by using the transfection agent of polyethylenimine is feasible, efficient and safe. The labeled cells could be tracked in vitro on MR imaging.

【Key words】 Stem cells; Magnetic resonance imaging; Animals, laboratory

在干细胞移植的研究中,如何无创伤性地在活体内动态示踪移植细胞的迁移、生存状态是近几年研究热点之一。传统的示踪方法,如荧光染料标记、核酸标记、转基因、染色体法均需要在离体状态下进行组织学分析和鉴定,难以满足干细胞移植进入临床应用的需求<sup>[1]</sup>。目前已有较多关于干细胞磁性标记的研究。在体外实验中,利用 MRI 进行干细胞的示踪已取得成功,而且在一些疾病,如脑缺血、心肌缺血的动物模型中,利用 MRI 示踪移植入体内的干细胞亦已取得成功,并在活体水平观察到磁性标记的干细胞向缺血损伤部位迁移的过程。MRI 被认为是干细胞监测及示踪的较为理想的手段<sup>[2-13]</sup>。在 MRI 示踪剂方面,以单或多晶体氧化铁为基础的铁类对比剂,由于铁的较强  $T_2^*$  负性对比效应[同样条件下弛豫率约为钆(Gd)的 7~10 倍,纳摩尔级浓度即可在 MRI 上形成对比],且具有生物可降解性,被广泛应用于细胞磁性标记及 MRI 活体示踪<sup>[2-10]</sup>。临床广泛使用的 Gd 类对比剂,其  $T_1$  正性对比效应不及铁的  $T_2^*$  负性对比效应明显,应用报道不多<sup>[11-13]</sup>。本研究拟采用临床应用型对比剂钆喷替酸葡甲胺(Gd-DTPA)及荧光染料罗丹明对大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)进行双标记,检测标记后细胞的活力及增殖力,探讨干细胞磁标记及荧光双标记方法的可行性及安全性,并对磁标记干细胞进行 MRI,了解 MRI 示踪 Gd 标记干细胞的能力,为干细胞移植的活体示踪奠定更

多的方法学基础。

## 资料与方法

### 一、实验材料

1. 实验动物: SD 大鼠 12 只(中山大学动物实验中心提供),体重 80~120 g,雌雄不限。本研究对动物的处理符合中山大学动物实验伦理学规范。

2. 主要试剂: DMEM/F12 (Dulbecco's modified eagle's medium) 培养液(Hyclone 公司)、胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所)、台盼蓝(Sigma 公司)、四氮嘧啶蓝(MTT, Fluka 公司)、二甲基亚砜(DMSO, 上海生工生物工程有限公司)、膜联蛋白 V (AnnexinV)-异硫氰酸荧光素(FITC)凋亡检测试剂盒(Becton Dickinson 公司)。Gd-DTPA (Magnevist, Schering 公司)、聚乙烯亚胺-罗丹明复合物(JetPEI-FluoR, PolyPlus-transfection 公司)。

3. 主要设备:  $\text{CO}_2$  培养箱(Herabius 公司)、超净工作台、倒置相差显微镜(Nikon 公司)、荧光倒置显微镜(Nikon 公司)、流式细胞仪(BD 公司)、日立 H-600 透射电子显微镜、1.5 T MR 成像系统(Gyroscan Intera, Philips 公司)。

### 二、实验方法

1. MSCs 的分离、培养与鉴定: 大鼠颈椎脱臼处死后,无菌操作取出胫骨及股骨,用不含血清的 DMEM 培养液冲洗骨髓腔,获得细胞悬液,转入含有 0.15 ml 肝素钠(10 万 U/L)的离心管中,

1000 r/min 离心 5 min, 去上清, 重悬细胞, 以  $5 \times 10^6$  个/L 接种于培养瓶中, 在 37 °C 的温度下以 5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养, 3 d 换液 1 次, 细胞铺满瓶底时用 0.25% 的胰酶消化后, 离心、去上清液, 重悬细胞按 1:2 传代, 每周 1 代。反复多次换液传代, 逐渐纯化 MSCs。取第 3 代细胞, 加入标记有 FITC 的 CD29、CD45、CD44、CD11b 抗体, 流式细胞仪测定细胞的免疫表型进行鉴定。纯化到第 5 代的 MSCs 用于后续实验。

2. Gd-罗丹明双标记示踪剂的制备及 MSCs 标记: 取 0.5 mol/L 的 Gd-DTPA 10.0 μl 加入 50.0 μl 150 mmol/L 的 NaCl 中混匀, 取等容积的 JetPEI-FluoR 加入 50.0 μl 150 mmol/L 的 NaCl 中混匀, 将后者一次性快速加入前者中, 振荡混匀, 室温下孵育 15 ~ 30 min, 制成双标记示踪剂。MSCs 标记时, 待细胞在培养瓶或培养板内生长到 50% ~ 60% 融合时, 直接加入适量的示踪剂于培养液中, 在 37 °C 温度 5% CO<sub>2</sub> 下温育 4 h 后, 弃去培养液, 0.25% 胰酶消化, 1500 r/min 离心, 磷酸缓冲液 (PBS) 洗脱 3 次, 去上清液, 所得细胞沉淀, 根据需求, 或加入培养液继续培养供后续增殖、凋亡和持久性实验用, 或加入 4% 明胶供体外 MRI 检测用。预实验对 Gd-DTPA 与 JetPEI-FluoR 的最佳容积比及孵育时间进行了正交实验, 确定标记用的示踪剂中 Gd-DTPA 与 JetPEI-FluoR 容积比为 1:1, 示踪剂与细胞孵育的时间为 4 ~ 6 h, 此条件下细胞的标记效率高、毒性较低。以下除非特殊说明, 细胞标记均据此条件进行。

3. MRI 体外检测: (1) 标记细胞的 MRI 检测: 取  $5 \times 10^5$  个细胞, 加入 20.0 μl 示踪剂标记 6 h 后, 消化、离心、收集细胞转入 1.5 ml 的 EP 管中, 置入盛有 37 °C 水的 EP 管盒内, 进行体外 MRI。其对照组为  $5 \times 10^5$  个细胞, 以 PBS 代替示踪剂, 其余操作同标记细胞。MRI 序列为 SE 序列, T<sub>1</sub> WI TR 500 ms, TE 20 ms, 层厚 1.5 mm, 层距 0 mm, 视野 (FOV) 90 mm × 60 mm, 矩阵 256 × 256, 信号平均次数 (NSA) 2 次; T<sub>2</sub> WI TR 2600 ms, TE 100 ms, 层厚 1.5 mm, FOV 100 mm × 100 mm, 矩阵 384 × 256, NSA 为 2 次。T<sub>1</sub> 测量: 使用 SE 及反转恢复 (IR) 序列交替的混合 (mixed) 回波序列, SE 序列 TR 3500 ms, TE 20 ms; IR 序列 TR 4000 ms, TE 20 ms, 反转时间 (TI) 400 ms, 8 个回波, 层厚 1.5 mm, 层距 0 mm, FOV 100 mm × 100 mm, 矩阵 256 × 256, NSA 为 1 次。测量标记细胞及未标记细胞的 T<sub>1</sub> WI 上信号强度及 T<sub>1</sub>。以上细胞标记及 MRI 检测重复进行

18 次。(2) 标记效率的检测: 取  $10^5$ 、 $10^4$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $10^3$  个不同密度的细胞, 分别加入 8.0、4.0、2.0、1.0 μl 示踪剂孵育 4 h 进行标记后, PBS 洗脱 3 次, 胰酶消化细胞, 转入 1.5 ml 的 EP 管, 离心, 将细胞沉淀重悬于 50.0 μl 的 4% 明胶中, 进行 MRI。每个细胞密度分别选取同等数量的未标记细胞作为对照, 观察 MR 检查能显示的最低标记细胞密度。(3) 标记持久性的检测: 取  $10^6$  个 MSCs, 20.0 μl 示踪剂孵育 4 h 后, PBS 洗脱 3 次, 加入新鲜培养液继续培养、正常传代。每传 1 代分别再取  $10^6$  个 MSCs, 胰酶消化后收集于 0.5 ml 的 EP 管内, 离心, 将含有细胞沉淀的 EP 管置入 EP 管盒内进行 MRI 检测。了解随细胞的增殖分裂及 Gd 标记细胞的持久性。

4. 标记 MSCs 的生物学性状测定: (1) 细胞活力测定: 取  $5 \times 10^5$  个 MSCs, 加入 10.0 μl 的双标记示踪剂, 分别孵育 4、6、12、24、48 h 后, 对细胞进行台盼蓝拒染实验, 计数存活的细胞比例, 观察标记后细胞的活力。以上每个时间点实验重复 6 次。(2) 细胞增殖能力测定: 采用 MTT 法, 将 MSCs 以每孔  $10^4$  个细胞接种于 96 孔培养板中的 94 个孔 (2 个孔空白校零), 培养 24 h 后, 分别加入 2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0 μl 双标记示踪剂, 每个浓度设 8 个复孔, 另设 8 个孔不加示踪剂作为对照, 6 h 后吸弃培养液, PBS 冲洗后加入培养液继续培养 5 d 后, 每孔加入 MTT 溶液 (5000 mg/L) 20.0 μl, 继续孵育 4 h, 吸弃孔内上清液, 每孔加入 150.0 μl DMSO, 振荡 10 min, 置于酶联免疫检测仪下于 570 nm 波长下检测各孔吸光度。了解标记对细胞的增殖能力有无影响。(3) Annexin 和碘化吡啶 (PI) 双染色法检测细胞凋亡: 收集标记、未标记组细胞各  $5 \times 10^5$  个, 分别加入 10.0 μl 示踪剂、10.0 μl PBS 孵育 6 h。标记完成后按照凋亡检测试剂盒说明书操作, 加入 Annexin V-FITC 10.0 μl 及 PI 5.0 μl, 在流式细胞仪上检测细胞凋亡指数, 以 Annexin 阳性/PI 阴性判断为早期凋亡, Annexin 阳性/PI 阳性判断为晚期凋亡或死亡细胞。

5. 荧光镜及电镜观察: 荧光显微镜下观测标记细胞内有无红色荧光。标记细胞用醋酸双氧铀和枸橼酸铅双染色, 透射电镜下观察细胞内有无高电子密度的 Gd 颗粒。

### 三、统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。标记细胞、未标记细胞的 T<sub>1</sub> WI 信号强度、T<sub>1</sub> 弛豫时间之间的比较采用

t 检验。标记细胞、未标记细胞的台盼蓝拒染率采用两因素重复测量资料的方差分析。MTT 实验中不同浓度示踪剂下细胞的吸光度比较采用单因素方差分析, 组间比较使用 Dunnett 检验。统计学分析使用 SPSS 15.0 软件, 检验水准为  $P < 0.05$ 。

## 结 果

### 一、干细胞双标记的鉴定

$5 \times 10^5$  个 MSCs, Gd-JetPEI-FluoR 双标记后, 在荧光镜下细胞胞质内均见红色荧光, 经流式细胞仪检测, 标记了  $4.25 \times 10^5$  个, 标记率为 85% (图 1, 2)。电镜下细胞内可见致密的高电子密度的颗粒, 围绕细胞器分布, 主要位于高尔基体周围(图 3, 4)。

### 二、双标记对干细胞生物学性状的影响

示踪剂与 MSCs 孵育在 24 h 内, 标记细胞的台盼蓝拒染率与未标记细胞间差异无统计学意义 ( $F = 4.523, P > 0.05$ ), 孵育 48 h 细胞活力下降 ( $F = 38.465, P < 0.01$ ) (表 1)。MTT 实验, 在 2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0  $\mu\text{l}$  不同浓度示踪剂时, 细胞的吸光度值分别为 ( $0.1884 \pm 0.0151$ )、( $0.1878 \pm 0.0190$ )、( $0.1741 \pm 0.0160$ )、( $0.1135 \pm 0.0215$ )、( $0.1079 \pm 0.0145$ )、( $0.0811 \pm 0.0079$ ),

对照组为 ( $0.1940 \pm 0.0116$ ), 经单因素方差分析总体有统计学意义 ( $F = 8.326, P < 0.01$ ), 进一步用 Dunnett 法组间比较, 30.0  $\mu\text{l}$  以下的示踪剂标记的细胞与对照细胞光吸收值差异无统计学意义 ( $q = 0.2225 \sim 0.9458, P > 0.05$ ), 而 40.0  $\mu\text{l}$  的示踪剂标记细胞的光吸收值比对照组低 ( $q = 5.0626, P < 0.01$ )。10.0  $\mu\text{l}$  示踪剂与细胞孵育 6 h 后, 标记细胞的凋亡指数为 5.08%, 对照组未标记细胞的凋亡指数为 3.86%。

表 1 标记细胞与未标记细胞的台盼蓝拒染率(%,  $\bar{x} \pm s$ )

细胞标记	孵育时间 (h)				
	3	6	12	24	48
标记细胞	$96.55 \pm 2.90$	$94.17 \pm 2.56$	$97.16 \pm 3.12$	$94.23 \pm 2.67$	$95.69 \pm 2.45$
未标记细胞	$95.86 \pm 2.67$	$92.04 \pm 2.21$	$93.38 \pm 3.64$	$92.12 \pm 2.53$	$87.85 \pm 2.87$

注: 每个孵育时间点实验重复 6 次

### 三、双标记干细胞的 MRI 检测

标记细胞与未标记相比,  $T_1$ WI 上信号增高,  $T_2$ WI 信号稍减低,  $T_1$  时间缩短。18 次重复实验中, 未标记细胞  $T_1$ WI 平均信号强度为  $240.3 \pm 24.7$ , 而标记细胞的平均信号强度为  $336.2 \pm 20.7$ , 两者间有统计学差异 ( $t = 12.656, P < 0.01$ ), 细胞标记后信

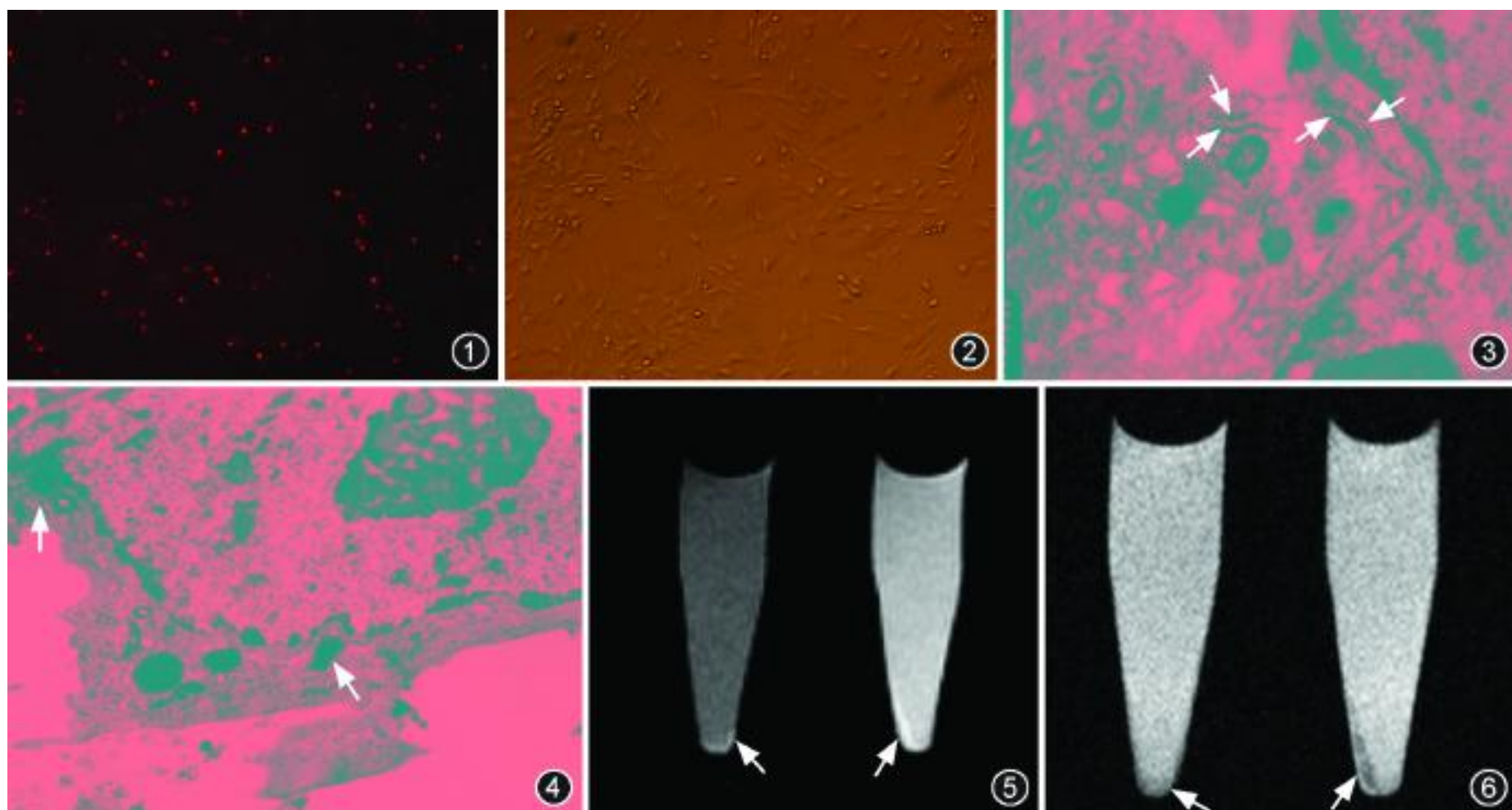


图 1, 2 双标记示踪剂标记间充质干细胞(MSCs) ( $\times 100$ )。示踪剂与 MSCs 孵育 6 h 后, 荧光镜下可见细胞内的罗丹明红色荧光(图 1)。相应的明光视野下可见荧光位于细胞质内(图 2)。图 3, 4 MSCs 标记后电镜观察。图 3 ( $\times 30\,000$ ) 显示致密的钆(Gd)颗粒主要位于高尔基体周围(箭)。图 4 ( $\times 12\,000$ ) 显示带有 Gd 的高电子密度的罗丹明复合物正穿过细胞膜进入细胞内(箭)。图 5, 6 Gd 双标记 MSCs 的体外 MRI。标记 MSCs 在  $T_1$ WI 上由于 Gd 的正性增强作用(右 EP 管), 较未标记的 MSC(左 EP 管)显示为高信号(图 5, 箭)。相应的  $T_2$ WI 上标记的细胞信号减低(图 6, 箭)。

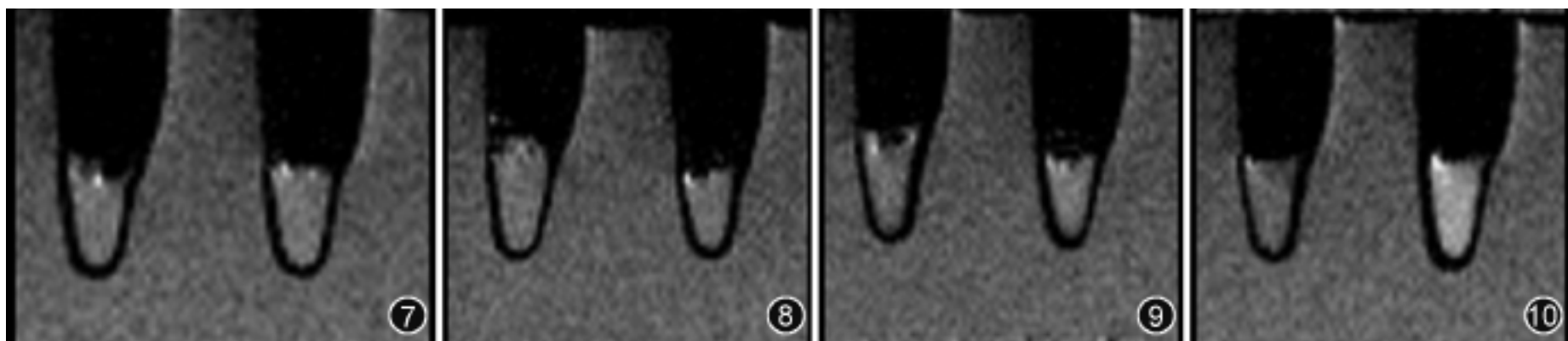


图 7 ~10 体外 MRI 检测钆 (Gd) 双标记间充质干细胞 (MSCs) 的效率。T<sub>1</sub> WI 上, 悬浮在 50 μl 明胶中的 10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、5×10<sup>3</sup> 个标记 MSCs 能显示出高信号, 而 10<sup>3</sup> 标记 MSCs 的信号强度与正常对照相似, 无明显信号差异。图 7 ~10 右侧分别为标记的 10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、5×10<sup>3</sup>、10<sup>3</sup> 个 MSCs, 左侧分别为相应密度的未标记的对照细胞

号强度增高 40%; 未标记细胞 T<sub>1</sub> 时间为 (2457 ± 56) ms, 标记细胞 T<sub>1</sub> 时间缩短, 为 (1102 ± 64) ms, 两者间差异有统计学意义 (t = 17.889, P < 0.01), 标记细胞较未标记细胞 T<sub>1</sub> 平均缩短 55% (图 5, 6)。T<sub>1</sub> WI 上随细胞数的减少, 信号改变越不明显, 可显示的标记细胞其最低密度为 5×10<sup>3</sup> 个 (图 7 ~10)。10<sup>6</sup> 个细胞经标记后, 进行正常传代, 随着细胞的分裂增殖, MR T<sub>1</sub> WI 信号逐渐由高减低, 传代到第 5 代时, 其信号强度与未标记细胞接近 (图 11)。

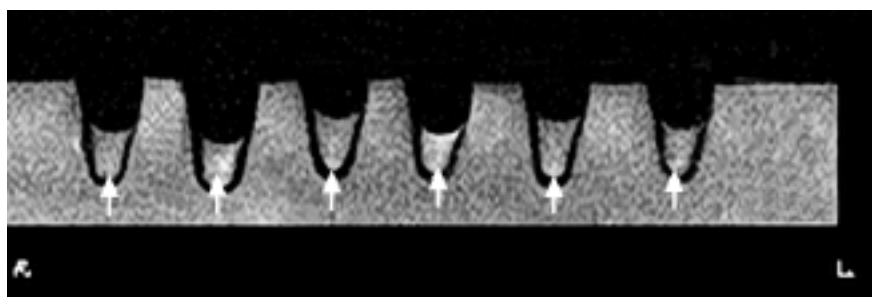


图 11 间充质干细胞 (MSCs) 钆 (Gd) 标记持久性的 MRI 检测。10<sup>6</sup> 个细胞标记后, 正常传代, 随着细胞的增殖, T<sub>1</sub> WI 显示细胞的信号强度逐渐减低, 至第 5 代时, 其信号强度与未标记细胞相似 (箭)。自左往右分别为未标记细胞、标记的第 1、2、3、4、5 代标记细胞

## 讨 论

### 一、干细胞磁标记技术

运用 Fe 类或 Gd 类顺磁性对比剂, 通过不同的载体如多聚赖氨酸、葡聚糖、脂质体等, 将 Fe 或 Gd 引入干细胞内, 对干细胞进行顺磁性标记, MRI 能藉细胞弛豫特性的改变而对干细胞进行无创性地检测及示踪<sup>[11]</sup>。Fe 或 Gd 标记的干细胞由于 Gd 明显的 T<sub>1</sub> 缩短效应和 Fe 明显的 T<sub>2</sub> 及 T<sub>2</sub><sup>\*</sup> 缩短效应, 使得细胞在 MRI 上出现特征性信号变化, 从而在体外或活体内为 MRI 所显示。其中氧化铁类中超顺磁性氧化铁 (SPIO) 和超微超顺磁性氧化铁因其粒径小及弛豫率高等优点, 而被广泛应用<sup>[11]</sup>。而 Gd 类对

比剂, 由于其 T<sub>1</sub> 弛豫率不及 Fe 类对比剂的 T<sub>2</sub><sup>\*</sup> 缩短效应, 要达到 MRI 示踪目的, 需要较高的浓度和较高的成像条件。另一方面, 标记细胞内引入的铁可参与细胞内铁的正常代谢而被机体利用, 且 Fe 类对比剂标记细胞后, 可直接进行普鲁士蓝染色, 易于在体内和体外进行病理组织学上的验证, 而 Gd 对比剂尚缺乏较好的病理组织学验证手段, 这也限制了单纯 Gd 对比剂在 MRI 示踪干细胞中的应用。但是, Fe 类对比剂示踪干细胞也存在一定的问题: 由于依靠 T<sub>2</sub><sup>\*</sup> WI 效应, 标记干细胞为较低信号, 在进行干细胞移植时, 如采取局灶性注射, 标记的细胞无法与带入的气泡和针道的低信号相区别, 同时由于 T<sub>2</sub><sup>\*</sup> WI 的放大效应, 依据信号强度改变往往会造成对实际移植入的干细胞数量产生过高估计<sup>[14-15]</sup>。Modo 等<sup>[11]</sup> 直接利用 Gd-DTPA 与葡聚糖、罗丹明 (Rhodamine) 合成了标记物罗丹明葡聚糖钆 (GRID), 既可因 Gd 的顺磁性效应而为 MRI 所检测, 也能因 Rhodamine 而在荧光显微镜下观察到标记的细胞, 从组织学上直接显示标记细胞, 解决了 Gd 对比剂标记细胞的病理组织学验证问题。但是他们使用的双能对比剂是自行在实验室合成, 需要严格的条件。本研究选用临床普及型 Gd 对比剂 Gd-DTPA, 利用结合有 Rhodamine 的阳离子多聚体作为载体, 对干细胞进行双标记, 标记的干细胞也能同时被荧光镜及 MRI 检测, 荧光镜下细胞标记效率达 85%, 电镜下观察 Gd 颗粒位于细胞内的细胞器周围, 尤其是高尔基体内, 且所用的载体已商品化、易得, 不需自行合成, 具有进一步普及应用的优势。

### 二、干细胞标记的安全性

磁标记对干细胞的安全性是干细胞磁标记体内应用的前提。大多数体外、动物活体实验表明, 使用适当浓度的示踪剂, 标记的干细胞其活性及增殖能

力并不受影响,能够正常分化,且顺磁性对比剂亦不会发生细胞外漏<sup>[6-8]</sup>,反映了干细胞磁性标记的安全性与可靠性。本实验结果显示,干细胞双标记后,孵育时间 24 h 以内,双标记示踪剂 30.0  $\mu\text{l}$  以下,示踪剂对细胞的活力、增殖能力及凋亡无明显影响,但如果孵育时间过长(48 h)或示踪剂量过大(40.0  $\mu\text{l}$ ),细胞的增殖能力及活力有较明显下降,因此在运用于体内实验时,应将示踪剂的孵育时间量控制在一定的安全范围内。

### 三、磁标记干细胞 MR 成像的效率及持久性

干细胞磁标记后其信号发生改变是活体示踪的基础,而信号的改变受对比剂种类及标记效率、细胞数量等因素的影响。Fe 类对比剂由于其特殊的化学结构即使在较弱的磁场中也可产生较大的磁性,造成局部磁场的均匀,从而加速了质子去相位的  $T_2$  弛豫,使组织信号降低, $T_2^*$  WI 序列对磁标记干细胞的显示最为敏感, $10^3$  个细胞即可引起明显的信号改变。Gd 对比剂主要用于缩短组织的  $T_1$ ,其敏感性较 Fe 类对比剂低,在本实验中体外  $T_1$  WI 能显示标记的细胞最低密度为  $5 \times 10^3$  个,随着细胞数目的增加,信号改变也相应增加,说明信号改变与细胞数目之间存在一定关系。磁标记干细胞后, MRI 能示踪的持续时间与细胞的分裂速度、对比剂在细胞内的分解途径有关。Fe 类对比剂标记不仅随着细胞不断分裂繁殖,细胞内 Fe 逐渐减少,信号降低的幅度也相应减少,而且另一方面由于 Fe 参与细胞的代谢,在分化快的细胞,其细胞内的 Fe 14 ~21 d 后消失,而未分化细胞胞质内的铁颗粒可存在 44 d<sup>[16]</sup>,而 Gd 主要游离于细胞质或高尔基体附近, Gd 在细胞内不能被降解,其  $T_1$  正性增强作用能持续保持,理论上 Gd 类具有标记持续时间相对长的优势<sup>[17]</sup>,Modo 等<sup>[11]</sup>发现 Gd 双能标记细胞后,活体内 14 d 内与 1 d 均可发现标记的细胞,两者无差别。本研究发现, Gd 标记细胞后,标记的细胞可持续到传代第 4 代(约 12 ~15 d)仍可被 MRI 检测出,显示 Gd-DTPA 标记细胞后利用 MRI 示踪干细胞在活体内的迁徙、归位具有较好的应用前景。

总之,本研究结果表明使用 Gd 及荧光物质对间充质干细胞进行双标记,可使之既能为荧光镜所检测,也能使标记细胞在体外为 MRI 所显示,且双标记示踪剂对细胞的生物学性状并无影响,是一种

具有良好前景的间充质干细胞示踪的方法。

### 参 考 文 献

- [1] 滕皋军,居胜红. 开展干细胞标记和 MR 活体示踪研究推进分子影像学发展. 中华放射学杂志, 2006, 40:117.
- [2] 居胜红,滕皋军,陆海华,等. 大鼠间充质干细胞超顺磁性氧化铁标记和经脾移植后的 MR 示踪研究. 中华放射学杂志, 2006, 40:127-132.
- [3] 王平,王建华,颜志平,等. 超顺磁性氧化铁标记大鼠骨髓基质细胞经门静脉移植 MRI 活体示踪的研究. 中华放射学杂志, 2006, 40:155-159.
- [4] 孙军辉,滕皋军,居胜红,等. 肾功能衰竭大鼠超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞肾脏移植 MR 活体示踪的研究. 中华放射学杂志, 2006, 40:144-148.
- [5] 蔡金华,冯敢生,王新,等. 大鼠骨髓间充质干细胞磁标记及 MR 成像研究. 中华放射学杂志, 2006, 40:155-159.
- [6] Daldrup-Link HE, Rudelius M, Piontek G, et al. Migration of iron-oxid labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment. Radiology, 2005, 234:197-205.
- [7] Bulte JW, Duncan ID, Frank JA. In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22:899-907.
- [8] Hoehn M, Kustermann 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] Arbab AS, Yocum GT, Wilson LB, et al. Comparison of transfection agents in forming complexes with ferumoxides, cell labeling efficiency, and cellular viability. Mol Imaging, 2004, 3:24-32.
- [10] Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, et al. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. Blood, 2004, 104:1217-1223.
- [11] Modo M, Cash D, Mellodew K, et al. Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. Neuroimage, 2002, 17:803-811.
- [12] Rudelius M, Daldrup-Link HE, Heinzmann U, et al. Highly efficient paramagnetic labelling of embryonic and neuronal stem cells. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2003, 30:1038-1044.
- [13] 刘敏,郭佑民,杨军乐,等. 穿膜肽标记异硫氰酸荧光素及钆喷替酸葡甲胺行 MR 分子显像的探讨. 中华放射学杂志, 2006, 40:139-143.
- [14] Cunningham CH, Arai T, Yang PC, et al. Positive contrast magnetic resonance imaging of cells labeled with magnetic nanoparticles. Magn Reson Med, 2005, 53:999-1005.
- [15] Pintaske J, Martirosian P, Claussen CD, et al. Positive contrast in the detection of magnetically labeled cells by MRI: in vitro experiments. Biomed Tech (Berl), 2005, 50:271-276.
- [16] Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, et al. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. Radiology, 2003, 229:838-846.
- [17] Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, et al. Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. Radiology, 2003, 228:760-767.

(收稿日期:2007-09-18)

(本文编辑:隋行芳)