

• 干细胞移植影像学 •

胎鼠神经干细胞超顺磁性氧化铁颗粒标记移植后 MRI 研究

薛静, 高培毅, 李晋, 孙崇然, 黄华, 安沂华

【摘要】 目的:探讨超顺磁性氧化铁颗粒(SPIO)标记神经干细胞的方法,以及标记细胞正常大鼠脑内移植后 MR 成像的方法学研究。**方法:**多聚左旋赖氨酸介导的 SPIO 标记胎鼠神经干细胞,进行台盼兰染色和普鲁士兰染色分别检测标记细胞的存活率和标记率。选取 SD 大鼠 15 只,简单随机法分为 3 组:第 1 组于大鼠右侧尾状核移植未标记的 NSCs,第 2 组于大鼠右侧尾状核移植标记的 NSCs,第 3 组右侧尾状核移植游离的 SPIO 颗粒,移植后第 1、4、8 周进行 MRI。8 周后处死大鼠,行组织切片普鲁士兰染色。**结果:**体外标记的神经干细胞普鲁士兰染色发现铁颗粒聚集于细胞浆内,标记率为 100%;标记细胞与未标记细胞的台盼兰染色结果无显著差异。移植后 MRI,第 1 组注射点未见低信号影;第 2 组注射点 T₂WI 及 GRE 序列均可见类圆形低信号影;第 3 组大鼠注射后 1 周注射点可见低信号影,4 周后低信号影变淡且边缘变模糊,8 周后低信号影 T₂WI 已不明显。与 T₂WI 序列比较,GRE 序列显示标记细胞更清晰,但显示范围较扩散。脑组织切片的普鲁士兰染色显示,第 1 组大鼠脑组织切片未见异常蓝染细胞,第 2 组注射点可见蓝染细胞,第 3 组注射点可见稍许散在蓝色颗粒状物质。**结论:**多聚左旋赖氨酸介导下 SPIO 可用于标记神经干细胞,标记细胞移植后 MRI 可以无创性观察移植神经干细胞的位置及分布情况。

【关键词】 超顺磁性氧化铁; 磁共振成像; 干细胞

【中图分类号】 R445.2; R816.1; R338.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2006)02-0110-04

Magnetic Resonance Tracking of Magnetically Labeled Rat Embryonic Neural Stem Cells after Transplantation XUE Jing, GAO Pei-yi, LI Jin, et al. Department of Neuroradiology, Beijing Tiantan Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, P. R. China.

【Abstract】 Objective: To explore the methods of labeling neural stem cells (NSCs) with superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles, and to monitor the labeled cells after transplantation into the rat with MR scanning. **Methods:** Neural stem cells, labeled with SPIO mediated by poly-L-lysine, underwent Trypan blue staining to observe cell viability of the labeled cells and Prussian blue staining to evaluate the labeling rate. Fifteen rats were divided into three groups in random: the unlabeled and labeled NSCs, and free SPIO particles were transplanted into the right caudate nucleus respectively. MR scanning was performed to monitor the transplanted cells after 1, 4, 8 weeks. After MR imaging, the rats were killed and underwent Prussian blue staining of the histological section. **Results:** Prussian blue staining of the cells showed numerous blue stained particles in the cytoplasm of the labeled cells. There was no significant difference between the results of Trypan blue staining in labeled and unlabeled cells. The MR imaging showed significant hypointensity in the transplanted areas after 1, 4, 8 weeks in the group of transplantation of the labeled cells. No any abnormal low signal intensity was observed in the rats of transplantation of the unlabeled cells. For free SPIO particle group, hypointensity also could be observed after 4 weeks, but the T₂ relaxation time was prolonged, and after 8 weeks, the low signal intensity became blurred. The Prussian blue staining of the perfused tissue showed numerous blue stained cells in the right caudate nucleus, which was the same area with the MR imaging. **Conclusion:** Poly-L-lysine mediated SPIO can be used to label NSCs, and MR scanning is useful in tracking the location and distribution of the labeled neural stem cells after transplantation.

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

通过移植神经干细胞治疗中枢神经系统损伤是近年来研究的热点,然而,如何监测移植后的神经干细胞

是关键,已进行的动物实验主要是通过以下几种方式,如活性染料、氘化胸腺嘧啶、坚固兰、特异性 Y 染色体原位杂交、乳酸受体基因标记准备移植的神经干细胞,进而利用免疫组织化学方法监测移植的干细胞。这些标记方法虽然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

作者单位:100050 北京,首都医科大学附属北京天坛医院神经影像中心(薛静、高培毅);100050 北京市神经外科研究所神经干细胞室(李晋、孙崇然、黄华、安沂华)

作者简介:薛静(1973—),女,黑龙江哈尔滨人,博士研究生,主治医师,主要从事神经影像学研究。

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7062013);北京市自然科学基金资助项目(7032009);国家自然科学基金资助项目(30370427)

制了细胞移植在临床中的应用。因此,有必要建立一种活体显示移植细胞的方法。

随着超顺磁性 MR 对比剂的研制成功及 MRI 方法的快速进展, MRI 可用来动态示踪观察移植的神经干细胞。本研究采用超顺磁性纳米氧化铁颗粒(supparamagnetic iron oxide, SPIO)标记大鼠胚胎神经干细胞,移植入大鼠脑内后,进行 MRI,观察移植神经干细胞的位置和分布情况,探讨该方法的可行性。

材料与方法

1. 实验动物

孕鼠 1 只(孕 14 天 Wistar 大鼠购自中国医学科学院动物所)、15 只清洁级 SD 雄性大鼠(购自维通力华动物所),体重 250 ± 20 g,每笼 6 只饲养,自由饮水和摄食,饲养室环境温度 $22 \sim 24$ °C,相对湿度 70% 左右,光照明暗比为 12 : 12。

2. 主要实验试剂及主要仪器设备

细胞培养试剂:细胞培养基 DMEM/F12(1 : 1, Gibco 公司)、碱性成纤维母细胞生长因子(bFGF, PeproTech 公司)、表皮生长因子(EGF, PeproTech 公司)和培养基添加剂 B27(Gibco 公司)购自晶美生物工程有限公司。SPIO(先灵公司)、多聚左旋赖氨酸(PLL, Sigma 公司)。

倒置相差显微镜(XDS-1B)、手术显微镜(SXP-1C)、立体定位仪。MR 仪(GE, Signa3.0 超导型)。

3. 实验方法

大鼠胚胎神经干细胞的分离、培养:断髓法处死孕 14 d 的 Wistar 大鼠,严格无菌条件下取出胎鼠的脑组织,彻底剥离脑组织表面的软脑膜和血管,将脑组织剪碎,经 120 目铜网过滤后,将六只胎鼠的滤液接种于培养瓶中,其内含 30 ng/ml bFGF、20 ng/ml EGF、1% B27 的 DMEM/F12(1 : 1)。置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中,隔日半量换液。

胚胎神经干细胞的标记:调节 SPIO 和 PLL 的浓度,将 50 μ g/ml SPIO、1.5 μ g/ml PLL(Fe : PLL = 1 : 0.03)共同加入 30 ml 含细胞培养基的 75 cm² 培养瓶中,室温下振荡 30~60 min。将含神经干细胞的培养基离心,加入 30 ml 新鲜培养基使细胞再次悬浮(调节细胞浓度为 2×10^6 /ml),在培养瓶中加入同体积的含 SPIO-PLL 的(此时 SPIO 和 PLL 浓度分别为 25 μ g/ml 和 0.75 μ g/ml),放在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中共同培养 18 h。

标记细胞和未标记细胞的普鲁士兰染色:将标记细胞和未标记细胞加入含血清的培养基中贴壁培养

后,用 4% 戊二醛固定 30 min 后, PBS 洗涤 3 次;在含 2% 亚铁氰化钾的 6% 盐酸溶液(Perl 试剂)中培养 30 min、PBS 洗涤三次;1% 核坚固红复染 3 min,蒸馏水吸去多余的核坚固红,显微镜下观察。

标记细胞的台盼兰染色:机械吹打细胞使之变成单细胞悬液后,分别取标记的和未标记的胚胎神经干细胞悬液(10^6 /ml) 0.9 ml 于试管中,各加入 0.1 ml 0.4% 台盼蓝,充分混匀后静置 1~2 min。用吸管小心混匀细胞悬液后,立即将其加入血球计数板。在显微镜下分别计算二者的活细胞百分率。

神经干细胞的立体定向移植:实验动物随机分为 3 组,每组 5 只大鼠,第 1 组右侧尾状核移植未标记神经干细胞,第 2 组右侧尾状核移植标记神经干细胞,第 3 组右侧尾状核移植游离的 SPIO(25 ng/ml)。移植细胞数为 2×10^6 个,体积为 20 μ l。大鼠麻醉、固定,切开头顶皮肤,以中线右侧 3 mm、冠状缝前 0.5 mm 为中心开骨孔,头皮针垂直进针,在进入 5.5 mm 后缓慢推入细胞悬液 20 μ l。留针 10 min 后缓慢拔针。

MR 成像:使用 5 英寸表面线圈,选取 T₂ WI 和 T₂*-GRE 序列,冠状面扫描,分别于移植后第 1、4、8 周后行 MRI。T₂ WI 扫描参数为:TR 3100 ms, TE 122 ms;视野 12 cm²;层厚 2 mm;矩阵 512 × 512。GRE 病例 TR 450 ms, TE 25 ms;翻转角 15°;带宽 7.81;视野 12 cm²;层厚 2 mm;矩阵 256 × 224。

普鲁士兰染色分析:移植 8 周后行 MRI,取 10% 水合氯醛胶浆 0.4 ml/100 g 体重腹腔内注射,左心室灌注 4% 多聚甲醛固定,断头取脑组织作冰冻切片,进行普鲁士兰染色。

结 果

胚胎神经干细胞:接种到培养瓶中的细胞以单细胞方式悬浮生长,接种后 24~48 h,镜下见单细胞的比例明显减少,多为数个细胞形成的悬浮微球(图 1)。

标记和未标记细胞的普鲁士兰染色分析:标记的细胞经普鲁士兰染色后,光镜下观察胞浆内可见大量着色颗粒,分别计数两个小室共八个大方格内所有的着色细胞数,标记率为 100%(图 2)。未标记细胞胞浆内未见着色颗粒。

标记和未标记细胞的台盼兰染色分析:标记和未标记细胞的活细胞百分率分别为 92% 和 95%,考虑快速机械吹打对神经干细胞有损伤,但两者间无显著性差异。

移植后 1 周, MRI 示第 1 组大鼠注射点处未见低信号影,第 2 组及第 3 组大鼠右侧尾状核(注射点)均

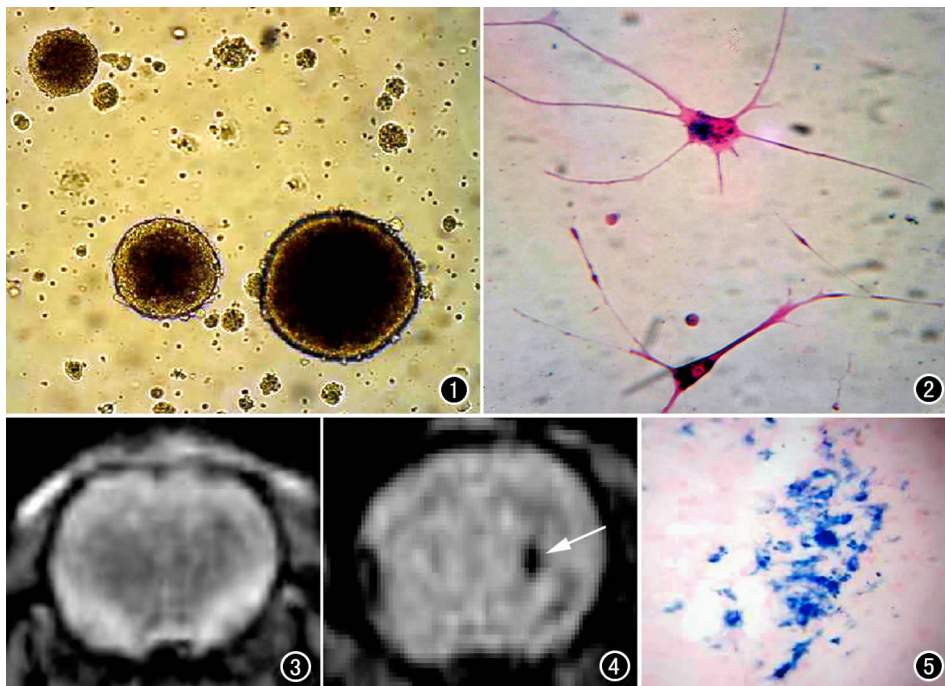


图 1 光镜下见呈球状生长的神经干细胞。图 2 标记细胞的普鲁士兰染色,胞浆内见染色颗粒。图 3 移植未标记细胞, T_2 WI 未见异常低信号影。图 4 移植标记细胞(8 周), T_2 WI 示右侧低信号为移植的标记细胞(箭)。图 5 组织切片普鲁士兰染色,示注射点处可见蓝染细胞。

可见类圆形局限性低信号影,边界清楚,GRE 序列示更为清晰。4 周后,第 1 组及第 2 组 MRI 无明显变化,但第 3 组注射点处低信号影变淡且边缘变模糊;8 周后第 2 组注射点 T_2 WI 及 GRE 序列仍可见低信号影,第 3 组低信号影在 T_2 WI 已不明显。与 T_2 WI 序列比较,GRE 序列显示标记细胞更清晰,但显示范围较扩散(图 3、4)。

移植模型脑组织切片普鲁士兰染色:第 1 组脑组织切片未见异常蓝染细胞。第 2 组注射点可见蓝染细胞(图 5),第 3 组注射点可见稍许散在蓝色颗粒状物质。

讨 论

1. SPIO 标记胚胎神经干细胞的方法

近年来,人们一直致力于研究高效无损伤性的 SPIO 标记干细胞的方法,总结各种方法,MR 对比剂主要通过以下三种机制选择性标记干细胞^[1]:①直接胞吞作用;②受体介导的胞吞作用;③转染试剂介导的胞吞作用,包括阳离子物质介导的胞吞作用和脂质体介导的胞吞作用。常用的阳离子转染试剂有 PLL、硫酸鱼精蛋白等。

本研究采用阳离子转染试剂 PLL 介导的胞吞作用标记胚胎神经干细胞,通过静电相互作用,带负电荷

的 SPIO 与带正电荷的转染试剂结合形成复合物刺激干细胞膜内吞作用,从而将铁颗粒转运至细胞内^[2-6]。本实验所用标记物浓度为 $25 \mu\text{g/ml}$,普鲁士兰染色测标记率为 100%。且通过台盼兰染色,与未标记细胞比较,该法不影响神经干细胞生存率。Jendelova 等^[7,8]使用 Endorem 直接标记胚胎干细胞,传代 3 次后普鲁士兰染色测定细胞的标记率为 81%,但标记使用的 Endorem 浓度较高,为 112.4 mg/ml 。因此,通过该初步研究证明使用 PLL 介导的标记方法标记率高,简单易行,可重复性强,便于推广应用。

2. 移植模型的 MRI 方法

SPIO 为一类颗粒物质^[7-9],是一种新型的磁共振细胞内对比剂。做为超顺磁性 MR 对比剂,它可以影响局部磁场均匀性,同时产生磁化率效应(susceptibility effect),从而加速共振质子的失相位,使 T_2 弛豫时间显著缩短,此类对比剂的 T_1 效应相对较弱。本实验采取 T_2 WI 和 GRE 两个序列观察移植的标记神经干细胞迁移及分布情况。标记的神经干细胞移植后, T_2 WI 和 GRE 移植部位均可见低信号影,GRE 序列上低信号影显示更清晰,这是由于 GRE 序列对超顺磁性物质更为敏感。而对照组移植未标记的神经干细胞移植部位未见异常信号。

3. MRI 监测标记的神经干细胞在大鼠脑内的位置及分布

本实验发现正常大鼠脑内移植神经干细胞 1~8 周后,仅注射点处始终可见标记的神经干细胞呈低信号显影,而其它部位未见异常低信号影,即未发现标记的神经干细胞在正常大鼠脑内的迁移。Jendelova 等^[7,8]使用 Endorem 和 BrdU 双标记大鼠骨髓间充质细胞,细胞直接移植到正常大鼠脑实质内,结果在正常大鼠移植细胞也未见细胞迁移,只在注射部位存活。Hoehn 等^[10]研究发现细胞的迁移与脑损伤局部释放的细胞因子有关。移植未标记的神经干细胞后脑内未见异常低信号,证明 MRI 对 SPIO 的特异性较高。本组将与标记细胞相同浓度的 SPIO 直接注入尾状核

后,8 周后 MRI 显示模糊,并经普鲁士兰染色证实游离的纳米铁颗粒通过细胞外间隙扩散,被巨噬细胞吞噬清除。相关研究显示 SPIO 经静脉注入体内后,与血浆蛋白结合,并在调理素作用下被主要位于肝 Kupfer 细胞的网状内皮系统吞噬、降解(铁离子游离),从血液中清除。它在血管内的半衰期只有 8~10 min。由于脑组织尤其是纹状体处结构致密,故清除速度相对较慢,但与细胞内的铁颗粒相比,仍具有明显差异。

通过以上研究证明 SPIO 可以作为干细胞标记物,利用 MRI 无创伤性的进行干细胞移植后的示踪监测。但尚有许多深入细致的问题需要进一步的研究,本课题组正在进行 SPIO 和 BrdU 双标记神经上皮细胞的研究,及其在缺血大鼠脑内移植后神经干细胞的迁移情况。

参考文献:

[1] Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, et al. Targeting of Hematopoietic Progenitor Cells with MR Contrast Agents[J]. Radiology, 2003, 228(3): 760-767.

[2] Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, et al. Intracytoplasmic Tagging of Cells with Ferumoxides and Transfection Agent for Cellular Magnetic Resonance Imaging after Cell Transplantation: Methods and Techniques[J]. Transplantation, 2003, 76(7): 1123-1130.

[3] Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, et al. Efficient Magnetic Cell Labeling with Protamine Sulfate Complexed to Ferumoxides for Cellular MRI[J]. Blood, 2004, 104(4): 1217-1223.

[4] Bjorklund LM, 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, 2002, 99(4): 2344-2349.

[5] Van den Bos EJ, Wagner A, Mahrholdt H, et al. Improved Efficacy of Stem cell Labeling for Magnetic Resonance Imaging Studies by the Use of Cationic Liposomes[J]. Cell Transplant, 2003, 12(7): 743-756.

[6] Frank JA, Miller BR, Arbab AS, et al. Clinically Applicable Labeling of Mammalian and Stem Cells by Combining Superparamagnetic Iron Oxides and Transfection Agents[J]. Radiology, 2003, 228(2): 480-487.

[7] Jendelova P, Vit Herynek, Lucia Urdzikova, et al. Magnetic Resonance Tracking of Transplanted Bone Marrow and Embryonic Stem Cells Labeled by Iron Oxide Nanoparticles in Rat Brain and Spinal Cord[J]. Neurosci Res, 2004, 76(2): 232-243.

[8] Jendelova P, Vit Herynek, Jane De Croos, et al. Imaging the Fate of Implanted Bone Marrow Stromal Cells Labeled With Superparamagnetic Nanoparticles[J]. Magn Res in Med, 2003, 50(4): 767-776.

[9] Zhang ZG, Jiang Q, Zhang R, et al. Magnetic Resonance Imaging and Neurosphere Therapy of Stroke in Rat[J]. Ann Neurol, 2003, 53(2): 259-263.

[10] Hoehn M, Kustermann E, Blank 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[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(10): 16267-16272.

(收稿日期: 2005-06-23 修回日期: 2005-08-21)

欢迎订阅 2006 年《放射学实践》

《放射学实践》是由国家教育部主管,华中科技大学同济医学院主办,与德国合办的全国性影像学学术期刊,由国内著名影像专家郭俊渊教授担任主编,创刊至今已 21 周年。本刊坚持服务广大医学影像医务人员的办刊方向,关注国内外影像医学的新进展、新动态,全面介绍 X 线、CT、磁共振、介入放射及放射治疗、超声诊断、核医学、影像技术学等医学影像方面的新知识、新成果,受到广大影像医师的普遍喜爱。

本刊为国家科技部中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库统计源期刊,在首届《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》执行评优活动中,被评为《CAJ—CD 规范》执行优秀期刊。

主要栏目:论著、继续教育园地、研究生展版、图文讲座、本刊特稿、实验研究、影像技术学、外刊摘要、学术动态、读片追踪、病例报道、知名产品介绍、信息窗等。

本刊为月刊,112 页,每册 8 元,全年定价 96 元。

国内统一刊号: ISSN 1000-0313/CN 42-1208/R 邮政代号: 38-122

电话: (027) 83662875 传真: (027) 83662887 E-mail: radio@tjh. tjmu. edu. cn

编辑部地址: 430030 武汉市解放大道 1095 号 同济医院《放射学实践》编辑部