

· 干细胞移植影像学 ·

体外磁共振成像对神经干细胞标记后弛豫活性的实验研究

李祥, 漆剑频, 朱文珍, 夏黎明, 王承缘, 魏黎, 雷皓, 田学馥

【摘要】 目的:研究超顺磁性氧化铁颗粒(SPIO)标记细胞后在细胞成像领域的应用价值。方法:SPIO与多聚赖氨酸(PLL)联合标记神经干细胞,使用4.7T磁共振对标记细胞进行 T_1 WI、 T_2 WI及 T_2^* WI扫描,并测量标记细胞及未标记细胞的弛豫率 R_2 和 R_2^* 。结果:①与未标记细胞相比,标记细胞于 T_1 WI时信号强度平均上升24.06%, T_2 WI时信号强度平均下降50.66%, T_2^* WI时信号强度平均下降53.70%。②未标记细胞和标记细胞的 T_2 分别为516ms和77ms,弛豫率 R_2 分别为1.94/s及12.98/s; T_2^* 分别为109ms和22.9ms,其弛豫率 R_2^* 分别为9.17/s及43.67/s。标记细胞的 R_2 及 R_2^* 分别约增强了5倍及4倍。结论:SPIO能够有效的标记神经干细胞,明显提高标记细胞的 R_2 及 R_2^* , T_2 WI和 T_2^* WI序列对显示标记细胞与未标记细胞间的信号差异较敏感。

【关键词】 干细胞; 超顺磁性氧化铁; 磁共振成像

【中图分类号】 R445.2; R816.1; R338.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2006)02-0114-04

Study on Relaxivity of Magnetically Labeled Neural Stem Cells with 4.7 Tesla MRI in Vitro LI Xiang, QI Jian-ping, ZHU Wen-zhen, et al, Department of Radiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, P. R. China

【Abstract】 Objective: To label neural stem cells with superparamagnetic iron oxide (SPIO) and study the relaxivity of labeled cells with 4.7 Tesla MRI in vitro. **Methods:** Rat neural stem cells were labeled with SPIO by the mean of receptor-mediated endocytosis. Prussian blue staining was conducted to identify the iron particles in these neural stem cells, and SPIO-labeled cells were examined with 4.7T MRI scanner in vitro. R_2 and R_2^* relaxation rates of labeled cells were calculated and compared with unlabeled cells. **Results:** ①4.7 Tesla MRI in vitro displayed that the signal intensity of labeled cells obviously decreased on T_2 WI and T_2^* WI, and slightly increased on T_1 WI when compared with unlabeled cells. ②The R_2 and R_2^* relaxation rates of labeled cells in 4.7 Tesla MRI in vitro increased nearly 5-fold and 4-fold respectively when compared with unlabeled cells. **Conclusion:** SPIO can be used to label neural stem cells effectively and can increase the relaxation rate of labeled cells obviously in vitro.

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

随着细胞治疗学的进展,如何动态监测用于治疗目的的细胞在体内的生存及功能状况成为一个难点。MR细胞成像技术具有高分辨力、无创、可重复等特点,能够较好的解决这一问题。目标细胞必需经MR对比剂标记后才能与背景组织区别而被MRI监测到,超顺磁氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)作为一种新型的MR对比剂已经成功的标记了多种细胞。本实验主要对SPIO标记细胞后对细胞成像的价值进行研究。

材料与方法

1. 实验材料

实验动物:出生24h内的新生SD大鼠(清洁级),

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科(李祥、漆剑频、朱文珍、夏黎明、王承缘),麻醉科(田学馥);430071 武汉,中国科学院武汉物理与数学研究所波谱与原子分子物理国家重点实验室(魏黎、雷皓)
作者简介:李祥(1976-),男,河南商丘人,硕士研究生,主要从事中枢神经系统影像学研究。

资助项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(30300093)

由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

主要试剂:细胞培养基DMEM/F12、碱性成纤维母细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、培养基添加剂B27(以上均为Gibco公司)、胎牛血清(FBS)(Hyclone公司)、超顺磁性氧化铁纳米粒子(SPIO)(Endorm,法国Guerbet公司惠赠)、多聚左旋赖氨酸(PLL)(Sigma公司)等。

主要仪器:CO₂培养箱、倒置相差显微镜、超净工作台、Bruker 4.7 Tesla超高场强磁共振机。

2. 实验方法

鼠神经干细胞的分离及培养采用悬浮法^[1]。

神经干细胞SPIO标记:将Endorem(SPIO, 11.2 mg Fe/ml)用神经干细胞培养基稀释成50 μg Fe/ml,加入PLL(Fe:PLL为1:0.03)。37℃孵育1h制成含Fe-PLL复合物的标记培养基。提取传代(第三代)后第二天增殖较活跃的神经干细胞,调整细胞浓度为4×10⁶/ml,等体积加入标记培养基吹散悬

浮,细胞培养瓶培养 12 h(最终标记浓度:细胞为 2×10^6 /ml, Fe 为 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$, PLL 为 $0.7 \mu\text{g}/\text{ml}$)后提取细胞,用 D-Hanks 液洗涤两遍,更换为无铁的神神经干细胞培养基继续培养 2 d 备用。

神经干细胞普鲁士蓝染色:将标记神经干细胞移入六孔板培养,放入 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ PLL 包被的盖玻片,一小时后待细胞充分贴壁后,取出盖玻片, D-Hanks 液洗涤三遍,4%多聚甲醛固定 20 min,蒸馏水洗涤 2 遍,Perls 反应液(等体积 20%盐酸与 10%亚铁氰化钾临时混合)作用 20 min,蒸馏水洗涤 2 遍,0.5%伊红复染 3 min,蒸馏水洗去多余的伊红,镜下观察。

神经干细胞标记后体外 MRI:提取标记干细胞及同批未标记神经干细胞,均调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml,另外用 $25 \mu\text{g}$ Fe/ml 含铁培养基、无铁培养基、蒸馏水作为对照。以上 5 组分别置入 5 个 1.5 ml Ependoff 管,行 4.7T 磁共振扫描。

扫描条件:横轴面 T_1 WI 采用 SE 序列,TR 300 ms,TE 11 ms,层厚 1.5 mm,间距 1 mm,矩阵 64×64 ,激励次数 3,视野 6 cm; T_2 WI 采用 FSE 序列,TR 4400 ms,TE 80 ms,层厚 1.5 mm,间距 1 mm,矩阵 64×64 ,激励次数 4。测量 T_2 弛豫时间时使用 6 个回波,其 TE 分别为 20、40、60、80、100 及 120 ms。 T_2^* WI 采用 GEFI 序列,TR 500 ms,TE 35 ms,翻转角 30° ,余参数同 T_2 WI。测量 T_2^* 弛豫时间时使用 6 个回波,其 TE 分别为 4、14、24、34、44 和 54 ms。

扫描序列包括 T_1 WI、 T_2 WI 和 T_2^* WI 三种,比较不同序列上标记细胞与未标记细胞的信号强度及其变化。计算信号强度变化率(ΔSI)的公式为:

$$\Delta\text{SI} = \frac{\text{SI}_{\text{标}} - \text{SI}_{\text{未}}}{\text{SI}_{\text{未}}} \times 100\%$$

注: $\text{SI}_{\text{标}}$ 及 $\text{SI}_{\text{未}}$ 分别为标记及未标记神经干细胞的信号强度。

T_2 弛豫时间的拟合公式为:

$$y = A + C * \exp(-t/T_2)$$

注: y : 时间为 t 时测量的信号强度, A 背景噪声, C^* 质子密度信号强度, t 回波时间。弛豫率的计算 $R_2 = 1/T_2$, $R_2^* = 1/T_2^*$ 。

结果

1. 神经干细胞形态观察及 SPIO 标记后神经干细胞内铁的鉴定

本实验采用悬浮法培养神经干细胞。刚接种时细胞以类圆形为主,呈单个悬浮状态,细胞折光性强。6 h 后见少量细胞贴壁生长。24~48 h 后,聚集成由 2~6 个细胞组成的球形,继续培养,随着神经干细胞不断克隆,球体不断增大,细胞数目不断增多,7 d 后已形成由数十至上百个细胞组成的悬浮神经球,大者直径可达 150~200 nm。机械吹打传代后可见大量单个细胞及少量未完全吹散的小神经球。继续培养见多个小的克隆球形成且不断增殖,同时有少量单个细胞贴壁,可见突起长出。培养 6~7 d 后再次传代。神经干细胞在 $25 \mu\text{g}$ Fe/ml 的标记培养基中培养 12 h,此期间吹散的单个细胞仍能形成多个由 2~8 个细胞组成的神经球,折光性强,略呈褐色。SPIO 标记后的神经干细胞继续培养 2 天,仍可不断增殖。但其增殖活性有待进一步评价。

将标记细胞行普鲁士蓝染色,光镜下观察,几乎每个标记细胞的胞浆内见多少不等的蓝染铁颗粒,标记率 100%,而对照组未标记 SPIO 的胞浆呈红色,其内未见蓝色铁颗粒(图 1、2)。

2. 标记神经干细胞的体外 4.7T MRI

4.7T 磁共振成像及弛豫率的测量,包括 T_1 WI、 T_2 WI 及 T_2^* WI。 T_1 WI 示未标记的细胞、无铁培养基及蒸馏水均呈低信号,标记细胞及含铁培养基信号与



图 1 细胞标记后普鲁士蓝染色,见胞浆内多少不等的蓝染铁颗粒,标记率 100%($\times 400$)。图 2 对照组未标记细胞普鲁士蓝染色,胞浆呈红色,未见蓝染铁颗粒($\times 400$)。图 3 4.7T MRI T_1 WI 见未标记细胞信号轻度升高。1 为蒸馏水,2 为无铁培养基,3 为 5×10^5 /ml SPIO 标记的神经干细胞,4 为标记细胞提取后的含铁培养基,5 为 5×10^5 /ml 未标记的神经干细胞。

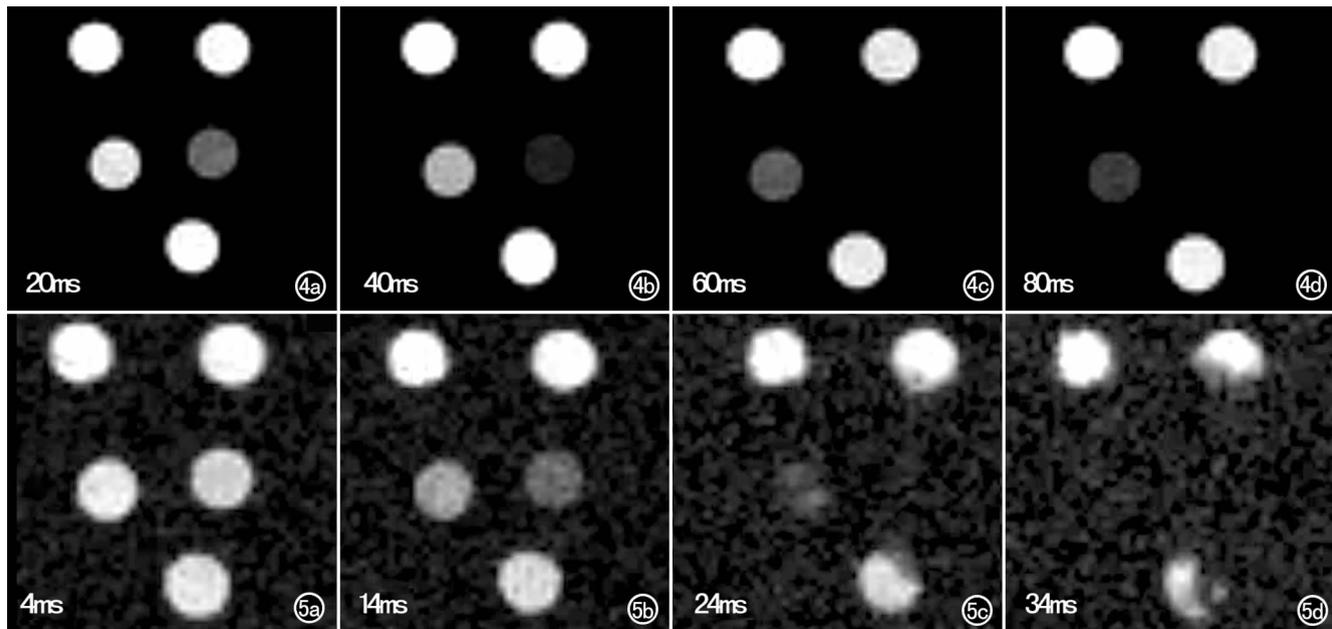


图4 不同时间的多回波 T_2 WI, 见标记细胞信号明显降低。a) 20 ms; b) 40 ms; c) 60 ms; d) 80 ms。图5 不同时间的多回波 T_2^* WI, 见标记细胞信号显著下降, 并见磁敏感效应所致的变形。含铁培养基也见相似的信号改变。a) 4 ms; b) 14 ms; c) 24 ms; d) 34 ms。培养基顺序同图3。

对照组比较均轻度升高, 而 T_2 WI 及 T_2^* WI 信号变化一致: 未标记的细胞、无铁培养基及蒸馏水均呈显著高信号, 以蒸馏水信号最高, 标记细胞及含铁培养基的信号均明显降低, 呈不同程度的低信号(图3~5)。

对三个序列中标记与未标记细胞信号强度变化计算的结果显示 T_1 WI 信号强度平均上升 24.06%, T_2 WI 信号强度平均下降 50.66%, T_2^* WI 信号强度平均下降 53.70%, 显示 T_2^* WI 信号强度变化最明显。 T_2 弛豫时间的计算采用 Multiple-Slice-Multiple-echo 多回波序列, 6 个回波。拟合出弛豫时间衰减曲线(图6), 根据 T_2 弛豫时间拟合公式由计算机算出未标记细胞和标记细胞的 T_2 弛豫时间分别为 516 ms 及 77 ms, 其弛豫率 $R_2(1/T_2)$ 分别为 1.94/s 及 12.98/s, T_2^* 弛豫时间分别为 109 ms 及 22.9 ms, 其弛豫率 $R_2^*(1/T_2^*)$ 分别为 9.17/s 及 43.67/s, 可见标记细胞的 T_2 及 T_2^* 弛豫时间显著下降, 相应的弛豫率 R_2 及 R_2^* 则显著升高, 因此 T_2 WI 及 T_2^* WI 标记细胞的信号强度明显下降。同样方法计算出无铁培养基与含铁培养基 (25 $\mu\text{g Fe/ml}$) 的 T_2 弛豫时间分别为 486 ms 及 25.9 ms, 其弛豫率 $R_2(1/T_2)$ 分别为 2.05/s 及 38.61/s, T_2^* 弛豫时间分别为 710 ms 及 17.1 ms, 其弛豫率 $R_2^*(1/T_2^*)$ 分别为 1.41/s 及 58.48/s;

讨论

SPIO 的晶核部分决定其磁化特性, 晶核由若干晶

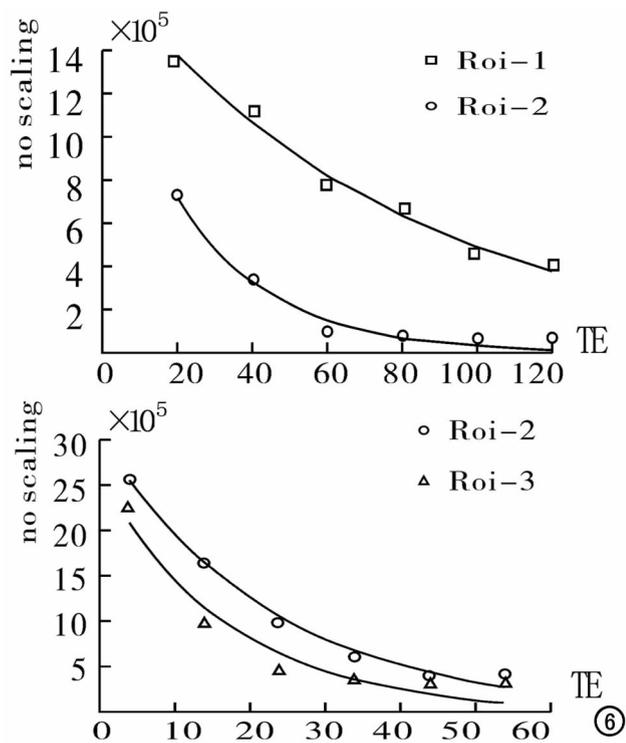


图6 弛豫时间衰减曲线。

胞组成, 其晶胞有多种不同空间构型的 Fe_3O_4 和/或 Fe_2O_3 晶型组成^[2], 其中铁原子含有不成对的核外电子, 核外电子高速旋转产生净磁化向量, 因此具有很强的顺磁性。它干扰局部磁场的均匀度, 水分子扩散穿过不均匀磁场时加速质子的去相位, 使质子 T_2 和 T_1 缩短, 表现为 T_2 WI 信号降低, T_1 WI 信号升高。但它

的 T_2 弛豫活性(R_2)与 T_1 弛豫活性(R_1)的比值为 4 : 1,对 T_2 的影响大于对 T_1 的影响。 T_2 弛豫率($R_2 = 1/T_2$)与 T_1 弛豫率($R_1 = 1/T_1$)的比值已被广泛用来评价 SPIO 对组织信号强度的影响。比值越大, T_2 效应(信号降低)就越强。而 USPIO 颗粒小,直径小于 50 nm, R_2 及 R_1 比值为 2 : 1,在缩短 T_2 的同时明显缩短 T_1 值。由于 SPIO 较 USPIO 具有更大的 R_2/R_1 比值,因此 SPIO 是一种更适合 T_2 WI 的细胞成像对比剂。本实验的结果显示出这一特点,即 T_1 WI 显示标记细胞及含铁培养基信号与对照组比较呈轻度升高, T_2 WI 及 T_2^* WI 显示标记细胞及含铁培养基信号与对照组比较呈明显的降低。 T_2 WI 及 T_2^* WI 的信号变化率明显大于 T_1 WI,有显著性差异。虽然梯度回波对 SPIO 引起的磁效应最敏感,且三个序列中以 T_2^* WI 信号强度变化率最大,但本实验中 T_2 WI 及 T_2^* WI 数据间并无显著性差异。

本实验使用的 SPIO 为 Endorem,属法国食品及药物管理局批准的 SPIO 的一种,由法国 Guerbet 公司提供, R_2 及 R_1 分别为 160 和 40 mmol/(L·s),比值为 4 : 1,直径为 120~180 nm,平均 150 nm。属多晶类氧化铁对比剂,晶核表面包被葡聚糖以增加其亲水性及稳定性。减少与血浆蛋白的反应和调理素的调理作用,增加血浆半衰期。

弛豫率是反映顺磁性物质对质子弛豫时间影响的指标。从公式可见一种顺磁性物质缩短质子弛豫时间的能力越强,弛豫率就越大,MRI 上信号差别越大。那么这种物质就越适合用作 MR 对比剂。本实验使用的超顺磁性物质主要缩短 T_2 时间,所以是适合 T_2 WI 或 T_2^* WI 的 MR 对比剂。

本实验中,无铁培养基与含铁培养基相比, R_2 由 0.002/s 提高到 0.039/s, R_2^* 由 0.001/s 增加到 0.058/s,分别增高了约 19 倍及 42 倍;未标记细胞与标记细胞相比 R_2 由 1.94/s 提高到 12.98/s, R_2^* 由 9.17/s 增加到 43.67/s,分别增高了约 5 倍及 4 倍。此结果说明 R_2 和 R_2^* 与铁的浓度有很大关系。Daldrup-link 等^[3]用几种 SPIO 标记造血干细胞,对细胞内铁量及 R_2^* 的测量结果表明 R_2^* 随细胞内铁量的增加而增大。其中使用 Endorem 标记的细胞组 R_2^* 平均达到 144/s。与本组数据差异其主要原因可能是细胞内铁量的不同。Ittrich 等^[4]的研究也表明弛豫率 R_2^* 与细胞内铁含量有强烈的相关性,相关系数大于 0.78。

本实验由于条件受限未能对细胞内铁的量进行测量,但通过对影响铁进入细胞因素的研究表明^[5-7],本组细胞内铁量小于 Daldrup-link 实验组。这些影响因

素包括标记细胞的吞噬能力、标记铁的浓度、标记方法、标记时间和标记细胞的浓度等。研究的结果表明较强的细胞吞噬能力,高的铁标记浓度,更有效的铁进入途径,长的标记时间及大的细胞浓度都将有助于增加细胞对铁的摄入量。

虽然细胞内铁的增加对弛豫率有积极的影响,但研究^[5-7]表明,逐渐增加铁标记浓度和延长标记时间将对细胞活性及增殖能力产生负面影响。本实验中采用的铁标记浓度和标记时间是目前普遍认为安全有效的。而且从本实验的结果(R_2 及 R_2^* 分别增高了约 5 倍及 4 倍)来看,能很好的满足 MR 细胞成像的要求。

有研究^[3]还对目前另一种常用的 MR 对比剂钆类对比剂与 SPIO 进行了对比研究,其中与 Endorem 比较,结果细胞内钆量是铁量的约五倍,而 R_2^* 只相当于后者的 3/5。而且 SPIO 中的铁可以参与体内的铁代谢。所以与钆类对比剂相比 SPIO 具有高弛豫率、低毒、生物相容性好等特点。

本实验研究结果表明,SPIO 能够以较低的浓度安全有效的标记神经干细胞,且标记细胞的 R_2 及 R_2^* 均明显提高,在 T_2^* WI 及 T_2 WI 表现出很强的信号差异。在细胞成像方面有很大的应用价值。

参考文献:

- [1] 吴洪亮,褚倩,王芙蓉,等. 脑出血大鼠脑内神经干细胞移植的研究[J]. 卒中与神经疾病,2004,11(5):283-286.
- [2] Jung CW, Jacobs P. Physical and Chemical Properties of Superparamagnetic Iron Oxide MR Contrast Agents: Ferumoxides, Ferumoxtran, Ferumoxsil[J]. Magn Reson Imaging, 1995, 13(5): 661-674.
- [3] 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.
- [4] Ittrich H, Lange C, Dahnke H, et al. Labeling of Mesenchymal Stem Cells with Different Superparamagnetic Particles of Iron Oxide and Detectability with MRI at 3T[J]. Fortschr Röntgenstr, 2005, 177(8): 1151-1163.
- [5] 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.
- [6] Daldrup-link HE, Rudelius M, Piontek G, et al. Migration of iron Oxide-labeled Human Hematopoietic Progenitor Cells in a Mouse Model: in Vivo Monitoring with 1.5T MR Imaging Equipment [J]. Radiology, 2005, 234(1): 197-205.
- [7] 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.