

# 心脏磁共振在体示踪移植细胞的可行性研究

何庚戌, 要彤, 张浩, 胡盛寿, 张晓玲

**【摘要】 目的:**寻找一种能够对移植细胞进行在体示踪的标记方法,为移植细胞存留、迁移提供重要观察手段。**方法:**从中华小型猪髂骨处抽取骨髓,体外培养扩增骨髓间充质干细胞(MSCs)。将 SPIO 和 MSCs 共同孵育培养 36h。普鲁士蓝染色评价细胞的标记效率;通过 MTT 比色实验评价 SPIO 对细胞生长能力的影响;台盼蓝染色检验标记后细胞的活性;使用 Costar Transwell 方法评价铁离子对细胞迁移能力的影响;用细胞分化诱导液培养标记后的细胞评价其向成脂肪细胞和成骨细胞的分化能力。在体内实验中将 SPIO 标记或未标记的自体 MSCs 注射到心肌内,通过心脏磁共振检查对移植细胞进行在体示踪观察,取材动物心脏行病理检查观察移植细胞的存活、存留。**结果:**MSCs 经铁离子标记后普鲁士蓝染色阳性率在 98% 以上,可见蓝色颗粒位于细胞浆内,标记细胞电镜切片可见高密度铁颗粒位于细胞浆内。随着培养液中 SPIO 浓度的增加细胞增殖能力没有明显改变;标记后 98% 的细胞保持活性;SPIO 标记后的细胞保持原有的形态,可继续培养、传代;SDF-1 和 VEGF 诱导的迁移实验发现标记细胞迁移能力没有降低;铁离子标记后细胞仍可向成脂肪细胞和成骨细胞分化。注射到心肌内的 SPIO 标记的 MSCs 可通过心脏磁共振检查进行在体示踪,动态观察显示 SPIO 标记细胞在磁共振图像上表现为低信号,并且在移植后 4 周仍可成像。病理学检查可以看到移植细胞呈普鲁士蓝染色阳性,并和影像学有很好的的一致性。**结论:**临床使用的 SPIO 磁共振对比剂可以安全、有效地标记 MSCs,心脏磁共振检查可以实现 SPIO 标记的移植细胞的在体示踪。

**【关键词】** 细胞移植;干细胞;对比剂;磁共振成像;心肌梗死

**【中图分类号】**R445.2 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1000-0313(2009)09-1007-05

**Study of the Feasibility of a Novel, Clinical Applicable Cell Labeling Method to Trace the Transplanted Cells in Vivo Using Cardiac Magnetic Resonance Imaging** HE Geng-qu, YAO Tong, ZHANG Jie, et al. Department of Cardiothoracic, General 251th Hospital, Hebei 075000, P. R. China

**【Abstract】 Objective:** In vivo imaging of the cells transplanted into the beating heart is very important for the study of the cell's retention and migration. This study was designed to find a new labeling agent to trace and visualize the transplanted cells in vivo. **Methods:** Bone marrow MSCs were incubated with SPIO for 48h. The labeling efficiency was tested through prussian blue staining, the growth ability was evaluated through MTT, and cells viability was tested through trypan blue rejection method, the migratory ability was assessed with costar transwell plates, the differentiation of labeled cells to adipogenic and osteogenic cells was induced with induction medium. The labeled or unlabeled cells were transplanted into the myocardium of Chinese mini swine. MRI was carried out immediately and 1~4 weeks later respectively. After MRI the heart was excised, the segment in which injections were performed were thin cut and stained with hematoxylin-eosin and Prussian blue staining. **Results:** There were intracytoplasmic blue particles in nearly every cell in prussian blue staining. SPIO had no toxic effect on the cells' growth and proliferation. The cells' viability was more than 95%. The migratory ability was not affected. The labeled MSCs could still differentiate to adipogenic and osteogenic cells after being incubated in inductive medium. The labeled cells could be detected through MRI and confirmed on pathology. After 4 weeks the injected labeled cells could still be detected through MRI. The pathology showed the transplanted cells could survive in the MI area, and parallel in the same direction. **Conclusion:** The cells could be efficiently and safely labeled with SPIO and the labeled cells could be reliably detected by MRI in vivo.

**【Key words】** Cell transplantation; Stem cells; Contrast media; Magnetic resonance imaging; Myocardium infarction

心肌细胞移植是目前缺血性心脏病研究中的热点和重点之一。对移植细胞的标记示踪是细胞移植研究中的一个重要内容。目前对移植细胞的标记是通过基

因修饰或荧光染料对细胞核或细胞膜进行标记,移植细胞在心肌组织内的存留、存活、迁移、分化等方面的信息只能在实验动物处死后的病理组织学检查中得到确认,因此细胞一旦移植到心脏内便无法进行在体的示踪观察。本实验评价了一种全新的、临床可以使用的铁磁性标记试剂对骨髓间充质干细胞的标记效率,以及对细胞活性、形态、生长、迁移、分化等生物学特性

**作者单位:**075000 河北,解放军 251 医院心胸外科(何庚戌);075000 张家口,北方学院第一附属医院(要彤);100037 北京,中国协和医科大学阜外心血管病医院卫生部心血管疾病再生医学重点实验室(张浩、胡盛寿、张晓玲)

**作者简介:**何庚戌(1970—),男,河北安国人,博士,副主任医师,主要从事细胞移植治疗缺血性心脏病方面的研究。

的影响,并通过心脏 MRI 技术对移植的、铁离子标记的骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 进行在体示踪,从而探讨这种新型标记手段的安全性,以及使用 MRI 技术示踪心肌内移植细胞的可行性,为未来细胞移植的动物实验和临床试验提供一种细胞在体示踪观察的手段。

## 材料与方法

### 1. 骨髓间充质干细胞(MSCs)的分离及培养

从中华小型猪髂骨处抽取骨髓血 30~40 ml,用 1.073 的 Percoll 淋巴细胞分离液进行密度梯度离心分离获取单个核细胞。在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下进行细胞培养,使用含 12% FBS DMEM 培养液,在第 3 天进行第一次换液,未贴壁的细胞随换液冲走,贴壁细胞继续培养,细胞培养第 9~10 天达到 70%~80% 融合时进行第一次传代。细胞培养 3 周约可获取  $1.0 \times 10^8$  个 MSC。

### 2. 细胞的标记方法及标记效率

用含多聚左旋赖氨酸(分子量 MW=175 KDa,美国 Sigma 公司) 400 ng/ml 和含不同浓度的超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO) 50 μg/ml、100 μg/ml、200 μg/ml (Resovist, 德国 Schering 公司) 的培养液与细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件共同孵育 36~48 h。MSCs 与含铁离子的培养液共同孵育 36 h 后,去除培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗细胞 3 次,去除未进入细胞浆内的铁离子。将细胞消化后制成细胞悬液。取少量细胞悬液接种在培养皿内,细胞贴壁后用 4% 多聚甲醛固定 10 min,普鲁氏蓝染色细胞,镜下观察细胞标记效率。另外一部分细胞悬液经离心收集细胞团块,制成超薄电镜切片,用透射电镜观察细胞标记后铁离子在细胞内分布的情况。

### 3. 铁离子标记对细胞活性、生长、迁移、分化能力的影响

分别用含 0 μg/ml、25 μg/ml、50 μg/ml、100 μg/ml、200 μg/ml、400 μg/ml 浓度 SPIO 的 DMEM 培养液培养细胞 3 天,然后使用 MTT(四唑盐比色试验)比色试验测定活性。接种细胞于 96 孔板,分别用上述浓度铁离子培养细胞 3 天后,PBS 冲洗,每孔加入 MTT 溶液 20 μl,继续孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入 150 μl DMSO(二甲亚砜),震荡 10 min,选择 490 nm 波长在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光值。

铁离子标记细胞消化传代,接种于培养皿内继续培养观察细胞贴壁和生长情况。

使用台盼蓝染色排除试验检测细胞活力。将标记

后的细胞消化后制成细胞悬液,取 9 滴加入小试管中,加 1 滴 0.4% 的台盼蓝溶液混匀,计数活细胞和死细胞,死细胞被染成淡蓝,活细胞拒染。

在评价细胞标记后对化学趋化因子 rhSDF-1 和 VEGF 诱导的趋化能力研究中,本试验使用 Costar Transwell 的双层 24 孔细胞培养板(直径 6.5 mm,孔径 5 μm,Corning 公司)。将标记和未标记的 MSCs 用无血清培养液制成细胞悬液( $10^6$ /ml),在培养板的底层加入 rhSDF-1 (200 ng/ml) 或 VEGF (10 ng/ml),在培养板的上层加入 100 ul 细胞悬液。6 h 后收集底层细胞通过流式细胞仪进行细胞计数。

干细胞成脂肪细胞诱导培养液含地塞米松 1 μM,黄嘌呤 500 μM,胰岛素 0.25 U/ml,消炎痛(储液溶于 DMSO) 200 μM。干细胞成骨细胞诱导培养液含地塞米松 0.1 μM,抗坏血酸 50 μg/ml,β-甘油酸钠 10 mM。分别在细胞培养 2 周后对细胞进行苏丹Ⅲ和茜素红染色观察细胞向成脂肪细胞和成骨细胞的分化情况。

### 4. 铁离子标记的 MSCs 在体示踪研究

中华小型猪(n=15),左前外侧开胸,分离冠状动脉前降支中下 1/3 处,给予结扎。在心肌梗死模型制作后 10 d,实验动物二次开胸,经由原手术切口进入胸腔。分离粘连组织,充分暴露心脏,显露梗死部位心肌,在梗死中心区和周围分别注射铁离子标记细胞  $2.0 \times 10^6$ /点(实验组,n=10),对照组(n=5)接受同等量的未经铁离子标记的细胞注射。每只动物接受移植点为 5 个。分别在细胞移植后当时和 1~4 周对实验动物使用 1.5T MRI 扫描机(CV/i GE Medical System,美国)进行心脏磁共振检查。

实验组移植细胞使用铁离子和荧光染料 DiI 双重标记,对照组仅用荧光染料 DiI 标记。

### 5. 病理学检查

实验组分别在动物接受细胞移植后当天、1 周、2 周、3 周、4 周进行 MRI 检查后各处死 2 只,对照组 5 只动物分别在上述 5 个时间点处死。所有心脏标本进行苏木素-伊红染色和普鲁氏蓝染色。

### 6. 统计分析

所有数据以平均值±标准差方式统计。统计软件采用 SPSS 11.0。细胞标记后迁移能力的比较采用 *t* 检验,不同浓度 SPIO 标记试剂对细胞生长的影响采用方差分析(one way analysis of variance, ANOVA)。*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1. 细胞的标记效率

骨髓间充质干细胞与 SPIO 共同孵育 36 h 后通过普鲁氏蓝染色可清晰显示在用含铁离子  $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ 、 $200 \mu\text{g/ml}$  的培养液培养细胞后 95% 以上的细胞胞浆内存在蓝色的颗粒状物质,表明铁离子进入细胞胞浆内,能够有效标记细胞。标记细胞透射电镜观察发现高密度的铁离子颗粒存在于细胞胞浆内(图 1)。

## 2. SPIO 对细胞的毒性及生长影响

细胞经 SPIO 标记后台盼蓝排斥试验发现细胞活力在 98% 以上,标记后的细胞消化后可继续培养、传代,细胞的生长状态良好,可持续培养 6 周,细胞活性不减低。MTT 比色试验发现随着培养液中 SPIO 浓度的增加,各组之间的光吸收值(OD 值)无明显差异,表明细胞数量随着培养液中 SPIO 浓度的增加无明显降低(图 2)。细胞经 SPIO 标记后对于化学趋化因子诱导的细胞迁移,与未经 SPIO 标记的细胞之间无明显的差异( $\text{SDF-1}\alpha$   $3112 \pm 241$  &  $3041 \pm 268$   $P=0.51$ ,  $\text{VEGF}$   $2402 \pm 286$  &  $2385 \pm 264$   $P=0.74$ ),表明 SPIO 对细胞的迁移能力没有影响(图 3)。标记后的骨髓间充质干细胞经成脂肪细胞诱导液培养后逐渐失去原先纤长的形态,变为圆形的细胞,有的细胞产生了含大量空泡状的结构。为了验证空泡状结构是分化成的脂肪细胞所特有的脂滴,诱导液刺激后两周进行了苏丹 III 染色,染色结果显示大部分的空泡被染成了红色,指示空泡中的确含有脂肪。经成骨细胞诱导液刺激后,骨髓间充质干细胞逐渐失去有规则的指纹状排列特征,细胞排列混乱,边界模糊。刺激后 1 周细胞表面出现八面体晶体,观察中发现这些晶体大小不一。诱导两周后对细胞进行茜素红染色,检测骨细胞所特有的钙化沉淀。结果显示成骨诱导液刺激的细胞中有红色着色,提示大量钙化沉淀存在(图 4)。表明 SPIO 标记没有影响细胞的分化能力。

## 3. MRI 检查

心肌内注射移植的 MSCs 可以通过常规 MRI

检查,在 MRI 图像上表现为明显的低信号影。10 只动物共接受细胞移植 50 点,其移植的细胞在心肌梗死区域或正常心肌内均可在 MRI 检查中成像,表现为低信号灶或信号缺失。移植后当天最明显,随着时间的推移在 1 周、2 周、3 周、4 周时仍然可以 MRI 检查中成像,但 MRI 图像中发现信号强度明显降低,范围扩大。对照组未观察到移植点细胞成像(图 5a、b)。

## 4. 病理检查结果

在细胞移植后当天实验组发现在移植部位有大量的普鲁士蓝染色阳性的圆形细胞聚集。在 1 周后便可发现存活的细胞分散,伸展呈梭形,并且沿同一个方向排列。4 周时在移植部位仍然可发现阳性细胞存活,沿同一方向伸展、排列。与 MRI 的结果一致:随着移植细胞的死亡和向周围组织的分散磁共振影像可能会变淡,范围扩大。普鲁士蓝染色颗粒均在存活细胞的胞浆内,没有发现有单纯的普鲁士蓝颗粒在细胞浆外存在。对照组均见普鲁士蓝染色阳性细胞存在(图 6)。

## 讨论

心肌细胞移植是最近年来缺血性心脏病治疗研究的热点之一,在大量动物实验和临床试验中证明能够改善梗死后心脏的功能,但移植细胞的最终命运只能

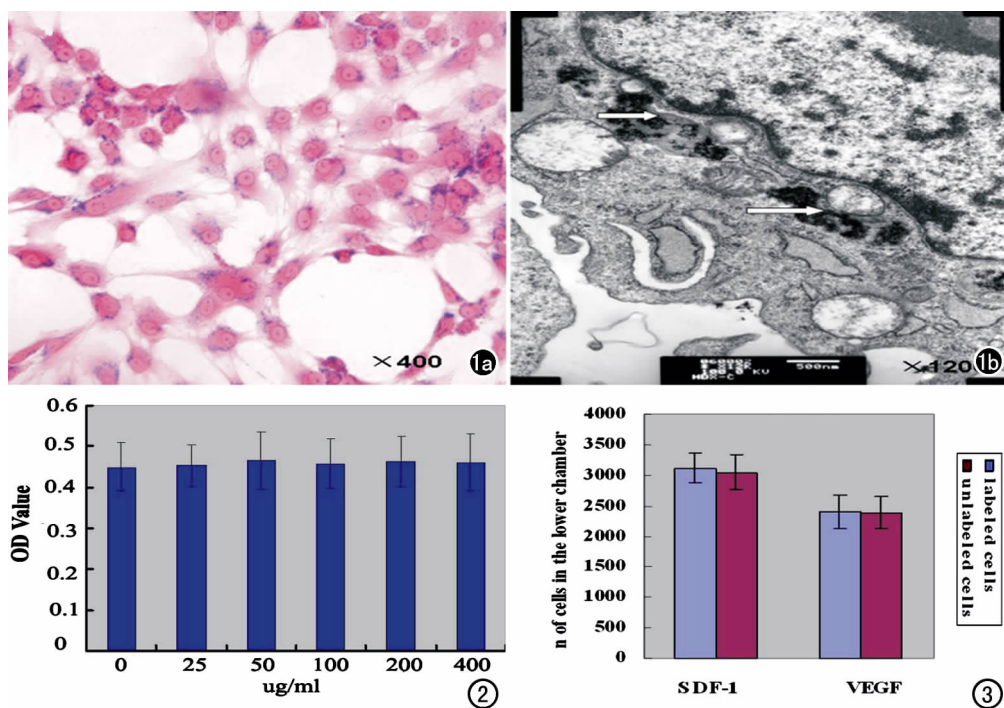


图 1 a) SPIO 标记后 MSCs 普鲁士蓝染色可见细胞浆内存在蓝染颗粒; b) 透射电镜可见高密度含铁颗粒位于细胞浆内。图 2 SPIO 对骨髓间充质干细胞生长的影响。横坐标为 SPIO 浓度( $\mu\text{g/ml}$ ),纵坐标表示 OD 值。图 3 铁离子标记对骨髓间充质干细胞迁移能力的影响。横坐标为不同细胞趋化因子,纵坐标为迁移细胞数量。

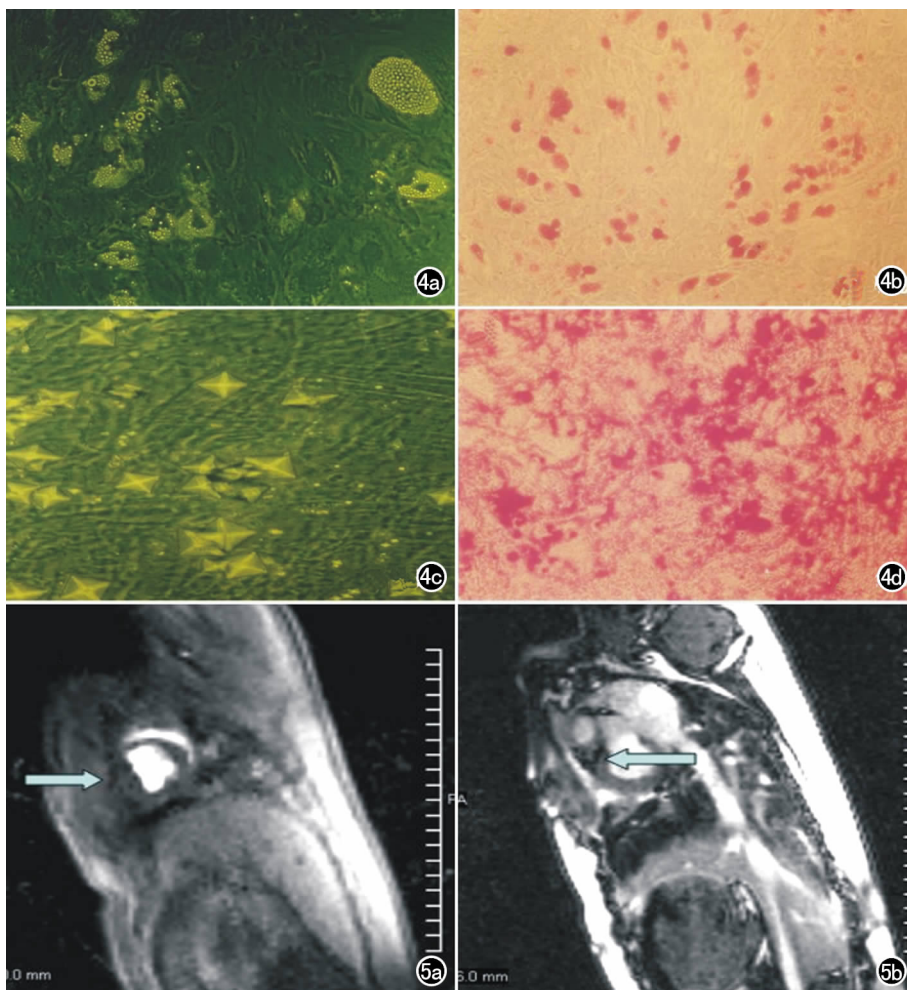


图 4 铁离子标记对骨髓间充质干细胞在诱导分化液作用下向脂肪细胞和成骨细胞分化的影响。a) 标记后 MSCs 在诱导分化作用下向脂肪细胞分化( $\times 200$ ); b) 标记后 MSCs 向脂肪细胞分化的苏丹Ⅲ染色( $\times 200$ ); c) 标记后 MSCs 向成骨细胞分化( $\times 200$ ); d) 标记后 MSCs 向成骨细胞分化茜素红染色( $\times 200$ )。图 5 SPIO 标记 MSCs 移植到心脏内后磁共振检查结果。a) 细胞移植后即时; b) 细胞移植后 4 周。

够通过病理组织切片得到证实,而在临床试验中无法得到细胞是否存活、迁移等方面的信息。部分学者采用放射性核素对移植细胞进行标记和在体示踪,但由于空间分辨力差和核素半衰期短而限制了其对移植细胞的空间识别和长期示踪<sup>[1-4]</sup>,因此寻找一种良好的细胞体内示踪方法具有重要的意义。MRI 技术在心血管疾病的诊断和评价方面的应用越来越广泛,近几年尤其在心梗的判断、预后评价、存活心肌的检测等方面逐渐显现出其优越性<sup>[5]</sup>。Bulte 等在进行神经干细胞的移植的实验中,将细胞用铁离子标记并用 MRI 进行了移植细胞的在体示踪,并发现通过信号强弱可间接判断细胞数量<sup>[6]</sup>。Garot, Hill, Kraitchman 等先后使用不同的氧化铁颗粒标记成肌细胞或骨髓间充质细胞,将其移植到梗死的心肌内进行移植细胞的 MRI 在体成像<sup>[7-9]</sup>。

在本研究目前的实验中使用了一种全新的细胞标记物(内二显, Resovist),此标记物是一种被炭氧葡聚糖包被的超顺磁性氧化铁微小颗粒,是组织特异性的磁共振对比增强剂,主要在临床上用于肝脏肿瘤的诊断,有很好的安全性,可用于未来细胞移植的临床研究。

一种理想的无创性细胞示踪剂应具备以下几个必要特性,首先是无毒,不影响细胞的活力、生长、分化和其他生物学特性;其次细胞示踪剂由携带细胞释放出后不会在组织内产生影像学效应。应该有一定的维持时间,有一定的排出途径;能用目前的检查手段进行反复的、无创的检测、示踪;能够准确的反映标记细胞的迁移和数量。

我们目前使用的是临床上常用的一种 MRI 对比增强剂,具有很多上述特性。在体外试验中发现普鲁士蓝染色 SPIO 标记后 MSCs,其中 95 以上的细胞胞浆内可见蓝色颗粒,可见细胞的标记效率很高。台盼蓝排斥试验发现 MSCs 经 SPIO 标记后细胞活力在 98% 以上,标记后的细胞仍保持原有的形态和良好的贴壁能力。通过

MTT 实验发现使用含不同浓度的 SPIO 培养细胞与对照组无明显差异,表明对细胞的生长增殖能力没有影响。迁移能力是干细胞的重要生物学特性之一,大量的实验表明干细胞有向缺血或损伤组织迁移的能力,因此一种新的细胞标记试剂对细胞迁移能力的影响直接关系到细胞移植的效果。在我们的实验中证明了 MSCs 经铁离子标记后,对化学趋化因子诱导的迁移没有改变。干细胞的一项重要生物学特性是其多向分化潜能, MSCs 具有向不同组织细胞分化的能力。在本组实验中评价了铁离子标记后骨髓间充质干细胞向成脂肪细胞和成骨细胞分化的能力,发现铁离子的标记对 MSCs 的分化能力没有明显的影响。通过以上的实验表明铁离子标记具有很高效率和良好的安全性。

体内实验中发现心肌内直接注射移植的 SPIO 标记的 MSCs 可以在心脏 MRI 上实现在体成像,在

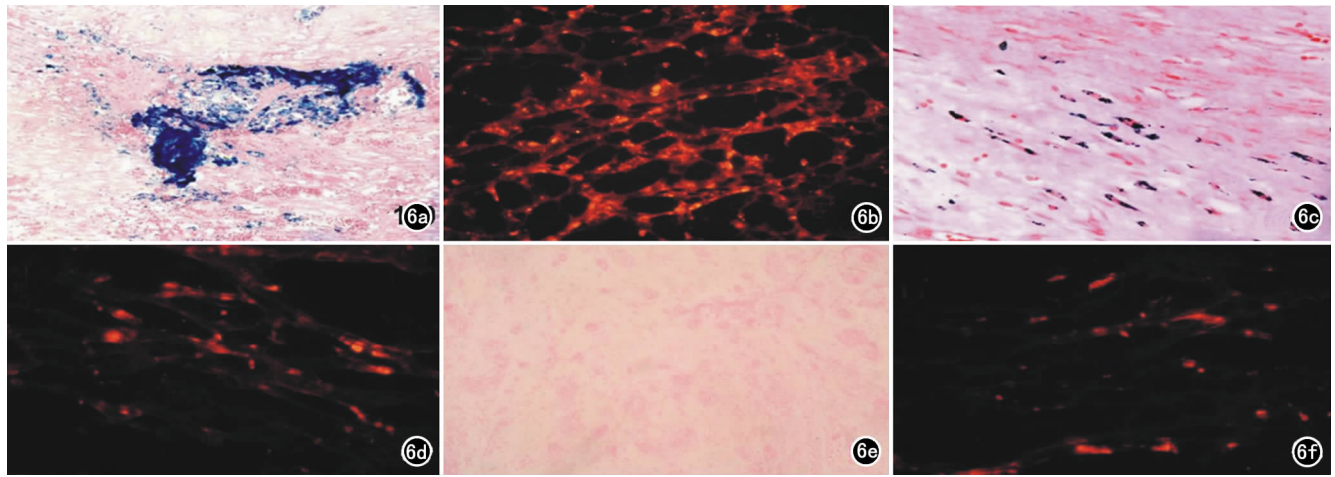


图6 心肌内注射移植后组织病理学检查。a) 普鲁士蓝染色( $\times 100$ )及 b) 冰冻切片示实验组细胞移植后当时组织学检查可见大量细胞在心肌组织内聚集( $\times 400$ ); c) 普鲁士蓝染色( $\times 400$ )及 d) 冰冻切片示实验组细胞移植后 4 周可见存活的细胞散在分布并按一致的方向排列( $\times 400$ ); e) 对照组细胞移植后 4 周普鲁士蓝染色未见胞浆内有蓝染颗粒细胞存在( $\times 100$ ); f) 对照组细胞移植后 4 周冰冻切片可见移植细胞( $\times 400$ )。

MRI 的图像上表现为低信号灶影,且随时间推移信号强度明显减弱,范围逐渐扩大,在细胞移植后 4 周仍然可以在磁共振上成像。病理学检查中发现与 MRI 有良好的解剖一致性,移植后当时可见细胞在心肌组织内聚集,而移植后 4 周可见存活的细胞分散排列。Kraitchman 等报道在移植后一周细胞移植部位的 MRI 范围会扩大 15%,信号强度会降低 24% 左右<sup>[8]</sup>。与我们的病理学发现相一致,可能是细胞向周围迁移或死亡导致局部细胞数量减少引起的 MRI 减弱并扩大。在 Bos 实验研究中发现将铁离子标记的 MSCs 注射到大鼠的肾动脉或门静脉内通过磁共振检查可以进行磁共振的在体示踪,证实铁离子标记的 MSCs 经血管内移植也可以在 MRI 图像中清晰成像<sup>[9]</sup>。本研究组织切片中还发现细胞移植后 4 周时蓝色的铁颗粒主要存在于细胞内,在细胞外的间质内基本没有细胞死亡后排出的铁颗粒,可见单纯的铁磁性标记物可通过某种途径很快被组织清除到体外,不会影响局部磁共振成像,表明磁共振成像的是存活细胞内的铁离子。由于核素的半衰期很短,对移植细胞的在体内再分布、存留只能进行短期示踪,而铁离子标记的细胞在移植后 4 周仍然能够在磁共振图像上成像,这将为移植后细胞的分布和迁移提供更多的信息。

本组实验证实了使用目前临床应用的这种超顺磁性氧化铁颗粒可以有效的进行细胞标记,而这种标记方法不会影响细胞的活力、生长、分裂、迁移、分化等生物学功能,对细胞没有毒性,是一种安全、有效的细胞标记方法,并且可以通过 MRI 检查对移植细胞进行在体示踪,为将来移植细胞的在体研究、示踪和临床应用

提供了一种良好的手段。

#### 参考文献:

- [1] Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al. Monitoring of Bone Marrow Cell Homing into the Infarcted Human Myocardium[J]. *Circulation*, 2005, 111(17): 2198-2202.
- [2] Hou D, Youseff EA, Brinton TJ, et al. Radiolabeled Cell Distribution after Intramyocardial, Intracoronary, and Interstitial Retrograde Coronary Venous Delivery: Implications for Current Clinical Trials[J]. *Circulation*, 2005, 112(9 Suppl): 1150-1156.
- [3] Penicka M, Widlmsky K, Kobylka P, et al. Early Tissue Distribution of Bone Marrow Mononuclear Cells after Transcatheter Transplantation in a Patient with Acute Myocardial Infarction[J]. *Circulation*, 2005, 112(4): e63-e65.
- [4] Kraitchman DL, Tatusmi M, Gilson WD, et al. Dynamic Imaging of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Trafficking to Myocardial Infarction[J]. *Circulation*, 2005, 112(9): 1451-1461.
- [5] Constantine G, Shan K, Flamm SD, et al. Role of MRI in Clinical Cardiology[J]. *Lancet*, 2004, 363(6): 2162-2171.
- [6] Hill JM, et al. Serial Cardiac Magnetic Resonance Imaging of Injected Mesenchymal Stem Cells[J]. *Circulation*, 2003, 108(8): 1009-1014.
- [7] Kraitchman DL, et al. In Vivo Magnetic Resonance Imaging of Mesenchymal Stem Cells in Myocardial Infarction[J]. *Circulation*, 2003, 107(18): 2290-2293.
- [8] Garot J, et al. Magnetic Resonance Imaging of Targeted Catheter-based Implantation of Myogenic Precursor Cells into Infarcted Left Ventricular Myocardium[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(10): 1841-1846.
- [9] Bos C, Delmas Y, Desmouliere A, et al. In Vivo MR Imaging of Intravascularly Injected Magnetically Labeled Mesenchymal Stem Cells in Rat Kidney and Liver[J]. *Radiology*, 2004, 233(3): 781-789.

(收稿日期: 2008-10-15 修回日期: 2009-02-06)