·实验研究 ·

新型超顺磁性氧化铁标记 SD 大鼠脂肪干细胞的有效性及安全性 研究

马伟琼,谢琦,张鼎旋,汤间仪,雷正贤,杨逸铭

【摘要】目的:采用新型超顺磁性氧化铁对 SD 大鼠来源的脂肪干细胞(ADSCs)进行标记,并与既往商用 SPIO 标记 效果进行对比,探讨这种新型超顺磁性氧化铁标记的有效性及安全性。方法:分离、纯化、鉴定 SD 大鼠来源的 ADSCs,然 后分不同浓度组(0、6、12、25、50 和 100 μg/mL)和时间组(6、12、24 和 48 h)进行标记,通过普鲁士蓝染色测定铁标记率:在 不影响细胞形态的前提下,对达到95%以上铁染色率的孵育浓度、时间进行标记安全性检测,包括活力、增殖力、细胞表面 抗原表达;采用透射电子显微镜观察标记细胞的超微结构,采用 ICP-AES 对标记细胞内的铁含量进行测定,并与商用 SPIO标记效果进行对比。结果:在无细胞毒性的前提下,新型 SPIO 达到 95%以上铁染色率的孵育浓度是 12 和 25 ug/mL,孵育时间是12 h;ICP-AES 检测显示具有表面正电荷的聚乙二醇(PEG)/聚乙烯亚胺(PEI)修饰的 SPIO 标记 后细胞内的铁含量达到 35.4 pg/cell(25 ug/mL 中孵育 12h 后)和 20.16 pg/cell(12 ug/mL 中孵育 12h 后),并随着孵育浓 度的增加,细胞内的铁含量增加;而具有表面零电荷的 PEG/聚乙烯吡咯烷酮(PVP)修饰的 SPIO 标记后的铁含量仅为 6.96 pg/cell(25 ug/mL 中孵育 12h 后);透射电子显微镜显示标记后细胞器结构完整,内吸收的 SPIO 主要位于细胞质内 的囊泡和溶酶体中。结论:新型 SPIO 在适当孵育浓度和时间下可以安全、快速标记 ADSCs; PEG/PEI 修饰的 SPIO 标记 效果要远远比既往商用的 SPIO 快速有效,可作为一种优势的新型磁性标记物用于干细胞标记;而 PEG/PVP 修饰的 SPIO 比起既往商用的 SPIO 并无明显优势,说明表面电荷在细胞标记中占有极其重要的角色。

【关键词】 新型超顺磁性氧化铁;脂肪干细胞;染色与标记;铁含量;表面电荷

【中图分类号】R814.3 【文献标识码】A 【文章编号】1000-0313(2016)05-0386-07

DOI:10.13609/j.cnki.1000-0313.2016.05.001

The research of effectiveness and safety on SD rat adipose-derived stem cells labeled with a new type of superparamagnetic iron oxide nanoparticles MA Wei-giong, XIE Qi, ZHANG Ding-xuan, et al. Department of Medical Imaging, Guangzhou First People's Hospital/Nansha Central Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, China

(Abstract) Objective: The aim of the present study was to explore the efficacy and safety of a new type of superparamagnetic nanoparticles (SPION) by labeling the SD rat adipose-derived stem cells (ADSCs) with SPION and comparing with our previous research results on commercial superparamagnetic iron oxide (SPIO). Methods: First, the SD rat ADSCs were incubated and labeled by different concentration groups $(0,6,12,25,50,100\mu g/mL, respectively)$ and by different time groups (6,12,24,48h, respectively) after isolation, purification and identification. The labeling rate of iron oxide nanoparticles were detected by prussian blue staining. Second, the safety of high labeling efficacy (>95%) in ADSCs were evaluated, under the condition of not affecting the cell morphology, with viability, proliferation, surface makers identification and neuronal induction. Third, the ultrastructure of labeled ADSCs were oberved by transmission electron microscopy (TEM). Fourth, the iron content of labeled ADSCs were measured with ICP-AES and compared with our previous research results on commercial SPIO. Results: Under the premise of with no cytotoxicity, the incubation concentration for high labeling efficiency (>95%) of the new SPIO were 12 and $25\mu g/mL$ at the incubation time of 12h. The ICP-AES measurements showed that the iron content in ADSCs was 35. 4pg/cell or 20. 16pg/cell at the incubation of PEG/PEI SPIO which carried permanent positive surface charge, whereas only 6.96pg/cell at the incubation of PEG/PVP SPIO (25µg/mL,12h). TEM imaging showed that the cellular ultrastructure was intact, and the nanoparticles uptake was dominantly located in the vesicles and lysosomes. Conclusion: At the incubation of appropriate concentration and time, ADSCs can be safely and quickly labeled with new type of paramagnetic nanoparticles. Compared with the commercial SPIO, the new type of PEG/PEI SPIO trends to be a more advantaged magnetic tracer to label stem cells. In contrast, the advantage of PEG/PVP SPIO is not apparent, which indicates that surface charge have played an extremely important role in stem cell magnetic labeling.

(Key words) New type of superparamagnetic nanoparticles; Adipose derived stem cells; Staining and labeling; Iron content; Surface charge

作者单位:510180 广州,广州医科大学附属广州市第一人民医院/广州市南沙中心医院医学影像部(马伟琼、谢琦、张鼎旋、汤间仪、雷正贤、杨 逸铭);516001 广东,惠州市中心人民医院放射科(马伟琼)

作者简介:马伟琼(1986一),女,广东梅州人,硕士研究生,医师,主要从事神经影像诊断与分子影像学研究工作。 基金项目:2014广州市南沙区经贸科技与信息化局民生科技项目基金(2014MS01);2014广州市医药卫生科技一般引导项目(20141A010015); 2015广州市科技计划项目科学专项(一般项目)基金(1563000424)及 2015 广东省科技计划项目技术开发类基金(2014A020212034)

由于磁性氧化铁纳米材料具有良好的磁导向性、 生物相容性以及生物降解性等特点,因而被广泛用于 干细胞标记领域^[1-2]。目前干细胞示踪成像的磁性氧 化铁纳米材料主要采用商用的 Resovist、Feridex 等, 但它们都是由化学共沉淀方法制备的,普遍存在粒径 不均匀、容易团聚的缺点,性能有提升的空间^[3]。此 外,由于细胞膜和商用的超顺磁性氧化铁纳米粒子 (superparamagnetic iron oxide,SPIO)均为负电荷,必 须与带有正电荷的商用转染剂(eg、脂质体、多聚赖氨 酸、硫酸鱼精蛋白等)结合起来才能有效标记干细胞, 这种结合存在复杂的相互反应^[4,5],会导致表面性能 的不精确和大小的不完全一致,这势必会引起标记效 果的差异性。

本研究拟采用的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)/聚乙烯亚胺(polyethylenimine,PEI)修饰 SPIO 是以高温多元醇法合成的,在合成过程中就通过表面 涂层修饰对纳米粒子的表面性能进行了精细控制,具 有结晶度高、尺寸分布均匀、磁性强、生物相容性好的 特点,并且具有固定的表面正电荷^[6]。笔者猜测这种 具有固有表面正电荷的新型 SPIO 也许能更有效地应 用于干细胞标记领域,本研究将其对 SD 大鼠来源的 脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)进行 标记,并与既往商用 SPIO 标记效果进行对比,探讨这 种新型超顺磁性氧化铁标记的有效性及安全性。本研 究实验组还引入用相同方法合成的带表面固定零电荷 的 PEG/聚 乙烯 吡咯 烷 酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP)修饰的 SPIO 进行对照标记,以探索表面电荷在 标记有效性中的作用。

实验方法

1. SD 大鼠 ADSCs 的提取、纯化、鉴定

取4周龄以内的SD大鼠(购自广东省医学实验动物中心),无菌条件下取腹股沟处的脂肪组织,反复冲洗,剪碎成大约1mm³的细小组织块;加入I型胶原酶(Sigma公司)进行恒温振荡消化,中止消化后进行离心,种植在含10%胎牛血清(Gibco公司)的DMEM/F12(Hyclone公司)培养瓶中,标记为原代细胞(P0),以1:2的比例传代,纯化提取出ADSCs,传代到P3代备用。

取 P3 代的培养细胞,用 FACScan 流式细胞仪 (美国 BD FASCantoTM)进行表面抗原 CD29、CD45、 CD44、CD106(Biolegend 公司)的检测。

2. 新型 SPIO 标记后 ADSCs 形态的观察和有效 孵育时间、浓度的初步选定

SPIO 由桂林理工大学张宝林教授团队以 PEG 作为溶剂,以乙酰丙酮合铁为铁源,加入 PEI、PVP 作为

表面涂层修饰剂制成氧化铁纳米粒子水溶液[6]。

取 6 孔板,细胞铺板,设置不同浓度(0、6、12、25、 50 和 100 μg/mL)和不同时间(6、12、24 和 48 h)组孵 育,然后进行普鲁士蓝染色,倒置显微镜下观察标记细 胞的形态,随机选择视野计数 100 个细胞,其中含蓝色 颗粒的细胞为标记阳性细胞,计算标记阳性率,分别计 数 3 次取平均值,初步选定达到 95%以上的标记率且 细胞形态无明显改变的孵育浓度和时间。

3. 标记细胞的安全性检测

细胞活力:将未标记组和标记组的单细胞悬液与 0.4%台盼蓝溶液以1:1比例混匀,3min内用计数板 计数后计算活细胞率(%)。

细胞增殖力:将未标记组和标记组的细胞分别在 1、3、5 d 进行 MTT 试验。实验时,每孔吸去 20 μL 培 养液,加入 MTT 20 μL,同上条件继续孵育 4 h 后弃上 清,加入 DMSO 150 μL/孔,室温下于圆周震荡器震荡 10 min,酶标仪选用双波长(570、630 nm)测量各孔的 光密度(optical density,OD)值,每孔重复测 3 次,减 去空白孔后取均值,绘制出生长曲线。

细胞表面抗原表达:将未标记组和标记组的细胞 加入荧光标记的大鼠来源 CD29、CD45、CD44、CD106 抗体,进行细胞表面抗原表达的检测。

4. 透射电子显微镜(transmission electron microscopy,TEM)观察

将标记后的细胞用 2.5%戊二醛(预冷)4 ℃固定 6h,然后用 1%锇酸固定 2.5h,梯度乙醇脱水,渗透、 包埋、聚合,常规超薄切片(70 nm),用铅铀染色 2h,使 用透射电子显微镜(日本 JEM1230)观察细胞超微结 构,包括 SPIO 所在部位以及线粒体、内质网、高尔基 体等细胞器的完整性。

5. 电感耦合等离子体原子发射光谱法(inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, ICP-AES)检测标记细胞内的铁含量

将标记后一定数量(106)的细胞放置在 15 mL 玻 璃管内,在每个样品中加入 65%~68%的浓硝酸,保 持 121℃高温高压反应,使样本充分溶解呈溶液。设 立标准样品分别为:空白、0.1、1、10、50、100(PPm),进 行 ICP-AES 定量检测。根据其定量结果得出标准曲 线,计算出单细胞铁含量。

6. 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,标记组和 未标记组的台盼蓝拒染率、MTT 吸光度差异的比较 采用单因素方差分析,数据符合正态分布的相关性分 析采用 Pearson 相关检验,数据不符合正态分布的相 关性分析采用 Spearman 相关检验,以 P<0.05 为差 异有统计学意义。



标记组 PE/Cy-CD106; d) 未标记组 FITC-CD45; e) 标记组 APC-CD29; f) 标记组 PE-CD44; g) 标记组 PE/Cy-CD106; h) 标记组 FITC-CD45。

结 果

1. SD 大鼠来源 ADSCs 的提取、纯化和鉴定

ADSCs 呈多角形、纺锤形、梭形贴壁生长, HE 染 色显示细胞核位于细胞中间,细胞梭形突起相互连接, 呈融合生长(图 1)。

流式细胞仪检测显示 P3代 ADSCs 对 CD29 的表 达为强阳性,达到 95%以上;对 CD44 的表达为阳性, 为 30%~40%;对 CD106、CD45 表达为阴性,表达小 于 5%(图 2)。

2. ADSCs 的有效孵育时间、浓度的观察和初步选 定 细胞内铁标记率随着浓度和孵育时间的增加而增加,同时,细胞的形态学也随着孵育浓度与时间的增加 而改变,细胞逐渐出现变形、皱缩、胞膜溶解的现象(表 1、2、图 3)。

PEG/PEI 修饰 SPIO 标记组在 12 μ g/mL、 25 μ g/mL浓度下孵育 12 h 后即可得到 95%以上的标 记率,细胞形态无明显改变(表 1、图 3a、b)。而 PEG/ PVP 修饰 SPIO 标记组在 25 μ g/mL、50 μ g/mL 浓度 下孵育 12 h 后即可得到 95%以上的标记率,细胞形态 无明显改变(表 2、图 3),并且发现 PEG/PVP 修饰 SPIO 标记组随着标记浓度的增加,细胞内铁颗粒增加

表1 不同浓度 PEG/PEI 修饰的 SPIO 孵育不同时间点 ADSCs 的形态变化和铁标记率测定

| | 6h 孵育组 | | 12h 孵育组 | | 24h 孵育组 | | 48h 孵育组 | |
|-------------------|------------------------|------------|----------------------------|------------|-----------------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| 不同标记浓度 | 细胞形态 | 标记率 (%) | 细胞形态 | 标记率 (%) | 细胞形态 | 标记率 (%) | 细胞形态 | 标记率 (%) |
| 未标记细胞组 | 梭形/短多角形 | 无 | 长梭形/多角形 | 无 | 梭形/多角形 | 无 | 梭形/多角形 | 无 |
| 6 μg/mL 标记组 | 梭形/短多角形 | 43 | 长梭形/多角形 | 70 | 梭形/多角形 | 90 | 梭形/多角形 | 94 |
| 12 μg/mL 标记组 | 梭形/短多角形 | 69 | 长梭形/多角形 | 98 | 梭形/多角形 | 100 | 梭形/多角形 | 100 |
| - 25 μg/mL 标记组 | 梭形/短多角形 | 91 | 长梭形/多角形 | 100 | 梭形/多角形部分胞膜溶解 | 100 | 细胞变形,胞膜溶 解,大量铁颗粒散出 | 100 |
| 50 µg/mL 标记组 | 梭形/短多角形 | 93 | 梭形/多角形, 部分胞膜溶解 | 100 | 长梭形/多角形,部分细胞 变形,胞膜溶解,铁颗粒散 出 | 100 | 细胞膜溶解,变形细 胞融合改变,散在团 状铁颗粒 | 100 |
| 100 μg/mL 标记组 | 梭形/多角形, 部分细胞略皱 缩 | 100 | 大部分细胞变 形,胞膜溶解, 铁颗粒散出 | 100 | 细胞变形、团聚,胞膜溶解, 铁颗粒散出 | 100 | 细胞变形、团聚,胞 膜溶解铁颗粒散出 | 100 |



图 3 PIO标记细胞后的普鲁士蓝染色图。a) 12 μ g/mL PEG/PEI 修饰的 SPIO 孵育 12 h 后,细胞达到 95%的铁标记率而无 细胞形态改变; b) 25 μ g/mL PEG/PEI 修饰的 SPIO 孵育 12 h 后,细胞达到 95%的铁标记率而无 细胞形态改变; c) 50 μ g/mL PEG/PEI 修饰的 SPIO 孵育 24 h 后,细胞变形、皱缩,出现胞膜溶解,铁颗粒散出的现象; d) 25 μ g/mL PEG/PVP 修饰的 SPIO 孵育 12 h 后,细胞达到 95%的铁标记率而无 细胞形态改变; e) 50 μ g/mL PEG/PVP 修饰的 SPIO 孵育 12 h 后,细胞达到 95% 的铁标记率而无 细胞形态改变; f) 50 μ g/mL PEG/PVP 修饰的 SPIO 孵育 24 h 后,细胞变形、皱缩,出现胞膜溶解,铁颗粒散出 的现象。

并不明显,只积聚在细胞质边缘靠近胞膜的区域。

 3.标记安全性检测(有效标记浓度和时间,细胞 形态无改变的前提下)

台盼蓝染色:台盼蓝染色结果显示,25 μ g/mL标 记组 2 孵育48 h,50 μ g/mL标记组 2 孵育 12、24 和 48 h后,ADSCs的活力较未标记细胞组下降,差异有 统计学意义(P<0.05),其余各组与未标记组比较差 异均无统计学意义(P>0.05,表 3)。

增殖力检测:增殖力曲线趋势图显示,12 μg/mL、 25 μg/mL PEG/PEI 修饰的 SPIO 标记组孵育 12 h 后,25 μg/mL PEG/PVP 修饰的 SPIO 孵育 12 h 后, 增殖力曲线与未标记组生长趋势无明显差异,其余标 记组增殖力曲线下降(图 4)。

经过标记率、细胞活力和增殖力的检测,选择 PEG/PEI 修饰的 SPIO 孵育浓度为 12 μ g/mL、 25 μ g/mL, PEG/PVP 修饰的 SPIO 孵育浓度为 25 μ g/mL,孵育时间均为 12 h;细胞表面抗原表达检 测、电镜观察均选择该孵育浓度和时间。

细胞表面抗原表达鉴定:流式细胞仪检测显示标记后的ADSCs对CD29的表达为强阳性,达到95%

表 2 不同浓度 PEG/PVP 修饰的 SPIO 孵育不同时间点 ADSCs 的形态变化和铁标记率测定

| | | | 401.46-201 | | 0 1 1 1 1 1 1 | | 101.00 | |
|-------------------|--------------------|------------|--------------------|------------|----------------------------------|------------|----------------------------|------------|
| | 6 h 孵育组 | | 12 h 孵育组 | | 24 h 孵育组 | | 48 h 孵育组 | |
| 不同标记浓度 | 细胞形态 | 标记率 (%) | 细胞形态 | 标记率 (%) | 细胞形态 | 标记率 (%) | 细胞形态 | 标记率 (%) |
| 未标记细胞组 | 梭形/短多角形 | 无 | 长梭形/多角形 | 无 | 梭形/多角形 | 无 | 梭形/多角形 | 无 |
| 6 μg/mL 标记组 | 梭形/短多角形 | 32 | 长梭形/多角形部分胞 膜溶解 | 51 | 梭形/多角形 | 87 | 梭形/多角形 | 91 |
| 12 μg/mL 标记组 | 梭形/短多角形 | 38 | 长梭形/多角形 | 69 | 梭形/多角形 | 90 | 细胞皱缩,局部融合 团聚 | 93 |
| 25 μg/mL 标记组 | 梭形/短多角形 | 41 | 长梭形/多角形 | 96 | 梭形/多角形,部 分胞膜溶解 | 100 | 细胞变形, 胞膜溶 解, 大量铁颗粒散出 | 100 |
| 50 µg/mL 标记组 | 梭形/短多角形 | 48 | 长梭形/多角形 | 97 | 梭形/多角形,部 分细胞变形,胞膜 溶解,铁颗粒散出 | 100 | 细胞膜溶解,变形散 在细胞碎片和铁颗 粒 | 100 |
| 100 μg/mL 标记 组 | 梭形/短多角形, 部分细胞皱缩 | 67 | 长梭形/多角形,部分 细胞皱缩 | 97 | 细胞变形、散在细 胞碎片、铁颗粒 | 100 | 未见正常细胞,散在 铁颗粒 | 100 |



胞质区域内,主要位于溶酶体内, 呈囊泡样聚集改变,细胞核内未见 纳米颗粒。PEG/PEI 修饰的 SPIO 标记细胞组内沉积的囊泡数 量要比 PEG/PVP 修饰的 SPIO 多,几乎蔓延了整个细胞质区域, 而后者主要聚集于靠近细胞膜的 区域(图 5);从电镜图片来看,胞 核不规则,染色质较均匀,细胞器 结构基本完整,内吸收的纳米颗粒 对细胞形态、结构无明显影响。

5. SPIO 的性能特性

将既往商用 SPIO 的材料性 能特性与本研究中的新型 SPIO 进行对比,结果见表4。

讨论

1. 多醇法合成的 SPIO 的性 能评价

PEG 由于其较高的水溶性, 并且无抗原性和免疫原性而可作 为高温多元醇法中的溶剂使用,在 修饰,不仅能提高 SPIO 在水中的 溶解性,而且能让纳米粒子在溶液

中稳定分散^[7]。PEI 是一种含有大量氨基的阳离子聚 合物,它一方面能够有效地中和胶体液中过量的负电 荷,尤其是在酸性或者中性环境下;另一方面其包含的 多量氨基能够与不同的物质相结合,从而使得合成的 SPIO 结构更加稳定,生物相容性和弛豫率亦有所提

图 4 12 µg/ml、25 µg/mlPEG/PEI 修饰的 SPIO 标记组孵育 12 h 后,25 µg/mlPEG/PVP 修饰的 SPIO 孵育 12 h 后,增殖力与未标记组比较无统计学差异(P>0.05),其余标记组 存在统计学差异(P < 0.05)。a) PEG/PEI 修饰的 SPIO 孵育 12 h 的 MTT 曲线图:b) PEG/PVP 修饰的 SPIO 孵育 12 h 的 MTT 曲线图。 图 5 TEM 观察细胞超微结构 (×20000),图中显示细胞结构基本完整,胞核不规则,染色质较均匀,细胞器结构基本完 整;内吸收的氧化铁纳米颗粒均位于细胞质区域内,主要位于溶酶体内,呈囊泡样聚集改 合成的 SPIO 表面进行 PEG 涂层 变(箭)。a) PEG/PEI 修饰的 SPIO 标记组; b) PEG/PVP 修饰的 SPIO 标记组。

以上;对 CD44 的表达为阳性,为 30%~40%;对 CD106、CD45表达为阴性,表达均<5%,与未标记组 之间差异无统计学意义(图 2b)。

4. TEM 观察

SPIO标记后,内吸收的氧化铁纳米颗粒均位于细

表 3 多醇法合成的 SPIO 孵育不同时间后 ADSCs 的台盼蓝染色拒染率结果

| 如购行订次座 | 孵育时间 | | | | | | | | |
|----------------|------------------|-------|------------------|------------|------------------|------------|------------------|-------|--|
| 细胞标化浓度 | 6 h | P 值 | 12 h | <i>P</i> 值 | 24 h | <i>P</i> 值 | 48 h | P 值 | |
| 未标记细胞组 | 97.05 ± 2.83 | _ | 97.01 ± 2.02 | _ | 96.40±2.41 | _ | 95.46 \pm 2.91 | _ | |
| 12 μg/mL 标记组 1 | 97.48 \pm 2.43 | 1.000 | 96.07 \pm 1.63 | 0.904 | 95.70 \pm 2.81 | 0.314 | 96.58 \pm 0.64 | 0.986 | |
| 25 μg/mL 标记组 1 | 96.04 \pm 2.13 | 0.962 | 97.68 ± 1.05 | 0.094 | 96.42 \pm 2.05 | 0.999 | 95.89 \pm 0.98 | 0.984 | |
| 25 μg/mL 标记组 2 | 96.36 \pm 1.69 | 1.000 | 96.67 \pm 1.93 | 0.904 | 97.44±1.56 | 0.998 | 85.45±1.89 | 0.000 | |
| 50 µg/mL 标记组 2 | 96.80 \pm 1.00 | 1.000 | 92.96 \pm 2.78 | 0.000 | 91.13 \pm 2.88 | 0.001 | 83.82±1.13 | 0.000 | |

注:标记组1是 PEG/PEI 修饰的 SPIO标记组:标记组2是 PEG/PVP标记组。P值为各标记组与未标记组的比较结果。

表 4 多醇法合成的 SPIO 和既往商用的 SPIO 性能特性对比

| 名称 | 表面涂层 | 动力学粒径 (nm) | Zeta 电位 (mv) | 铁含量 (pg/cell) |
|-----------------------|---------|---------------|------------------|------------------|
| Feridex | 葡聚糖 | $50 \sim 180$ | -32.29 ± 0.60 | 0.6~1.5 |
| Feridex-PLL | — | — | 24.00 ± 1.68 | 10 |
| Resovist | 羧基葡聚糖 | $17 \sim 65$ | -10.00 ± 3.65 | 0.92~4.00 |
| Resovist-PLL | _ | _ | 13.00 ± 3.71 | 5.0~17.9 |
| $SPIO(25 \ \mu g/mL)$ | PEG、PEI | $21 \sim 33$ | 25.00~43.00 | 35.4 |
| SPIO(12 μ g/mL) | PEG、PEI | $21 \sim 33$ | 25.00~43.00 | 20.16 |
| $SPIO(25 \mu g/mL)$ | PEG、PVP | $17 \sim 28$ | 0 | 6.96 |

高^[8]。PVP 是一种两亲性聚合物,Lu 等^[9]的研究中 发现这种以 PVP 为涂层的氧化铁纳米粒子溶解性和 稳定性更高,在不同的有机溶剂和不同 PH 值的水溶 液中(包括 PBS 液)中稳定分散。

而本研究中的新型 SPIO 是以 PEG 作为溶剂,以 乙酰丙酮合铁(Fe(acac)3)为铁源,加入 PEI、PVP 作 为表面涂层修饰剂制成^[6],具有以下优点:①可以分散 于水溶液中,一步合成水溶性的 SPION;②结晶性好, 磁性强;③粒径分布均匀,分散性好,基本没有出现团 聚的现象。

2. 高温多元醇法合成的 SPIO 与既往商用 SPIO 在标记有效性上的对比评价

本研究发现这种新型 SPIO 在 12~25 µg/mL 孵 育浓度,12 h 的孵育时间下即可达到 95%以上铁标记 率而无细胞毒性,而既往商用 SPIO 与转染剂结合后 要达到有效标记率的孵育浓度为 25~50 µg/mL,孵育 时间为 18~24 h^[10],说明这种新型 SPIO 能更快速有 效地标记干细胞;考虑是由于纳米粒子水动力学粒径 小于 100 nm,大小分布均一,有利于细胞对其吸收^[4], 并且表面修饰涂层的空间位阻以及粒子间的静电斥力 阻止了粒子间的团聚,使得纳米粒子结构更加稳定,进 一步促进了纳米粒子的吸收和内化^[11]。

随后的 ICP-AES 检测对标记细胞内的铁含量进 行测定进一步证实了这种新型 SPIO 在细胞标记领域 的有效性。既往研究表明,Feridex 在没有转染剂结合 的情况下,25 µg/mL 中孵育 24 h 后,细胞内的铁含量 为 0.6~1.5 pg/cell^[12,13],加入了一定浓度的多聚赖 氨酸(polylysine, PLL)结合后, 细胞内的铁含量可达 到 10 pg/cell^[10,12]。由于 Resovist 的水动力学粒径要 小于 Feridex,能更有效地促进粒子的吸收和内化^[12], 因此在相同的孵育浓度和时间条件下,细胞内的铁含 量可达到 0.92~4.00 pg/cell^[12,14],与 PLL 结合后,细 胞内的铁含量上升为 17.9 pg/cell^[5]。与此对比, PEG/PEI修饰的 SPIO 在 25 µg/ml 中孵育 12 h 后, 测定细胞内的铁含量达到 35.4 pg/cell;即使在 12 μg/mL中孵育 12 h,细胞内的铁含量也可达到 20.16 pg/cell。因此,无论是从标记的浓度和时间,还 是细胞内标记的铁含量来衡量,都提示本研究中的 PEG/PEI 修饰的 SPIO 比商用的 SPIO 能更加快速有 效地标记细胞。

除此之外,本研究还发现 PEG/PEI 修饰的 SPIO 标记效果要比 PEG/PVP 修饰的 SPIO 明显,前者在 不影响细胞生物活性的前提下,随着孵育浓度和时间 增加,细胞标记率提高,细胞内铁染色量和铁含量亦增 加;而 PEG/PVP 修饰的 SPIO 虽然在 25 µg/ml 的浓 度下孵育 12 h 后达到 95%以上的标记率,但随着标记 浓度的增加,普鲁士蓝染色显示细胞内铁颗粒增加并 不明显,只积聚在细胞质边缘靠近胞膜的区域,随后的 ICP-AES 测定细胞内铁含量仅达到 6.96 pg/cell,标 记效果与既往商用的 SPIO 对比并无优势;考虑是因 为细胞标记不仅仅与纳米粒子的直径大小有关,还依 赖粒子化学特性和表面电荷情况。有研究表明在外源 性的纳米材料向细胞内输送过程中,增加表面电荷能 够促使纳米粒子的吸收和内化^[11]。本研究中 PEG/ PEI 修饰的氧化铁纳米粒子表面为正电荷,而 PEG/ PVP 修饰的纳米粒子表面却是零电荷^[4],并不利于纳 米粒子向细胞内的输送,说明表面电荷在细胞标记中 占有极其重要的角色。

3. 标记的安全性评价

纳米颗粒表面涂层结构修饰除了影响细胞的标记 率,还会影响细胞毒性作用。Thorek 等^[11]的研究中 发现,在 10~50 μg/ml 浓度下的 SPIO 孵育后,只有 少量的可以忽略不计的细胞出现死亡,但在 SPIO 进 行了胺化的涂层后,即使是在 10 μg/ml 的浓度下,都 表现出了一定程度的细胞毒性,这种细胞毒性随着孵 育浓度的增加而加剧。因此本研究将达到有效标记率 的孵育浓度和时间进行了细胞毒性的测定,发现新型 SPIO 在适宜浓度和时间的条件下孵育后,不仅细胞活 力、增殖力无明显改变,而且相应的 ADSCs 表面抗原 表达能力与未标记组差异亦无统计学意义,因此考虑 该孵育浓度和时间孵育后对干细胞的生物学活性无明 显抑制作用。

一般来说,标记的安全性不仅需要评定标记对宿 主细胞生物学活性的抑制作用,还得考虑内吸收的纳 米铁颗粒进入细胞内如何代谢降解。目前普遍认为具 有明显生物相容性的 SPIO 应该是可以通过物理铁代 谢和利用的途径进行降解的[15]。现有的研究表明,进 入细胞内的氧化铁纳米粒子是作为元素铁被代谢的, 部分通过水解酶代谢,但主要还是在溶酶体的酸性条 件下被代谢的[14]。因此纳米粒子通过内吞作用进入 细胞质后,先位于细胞质中的溶酶体仓,然后再分发到 细胞核周围的囊泡以及终极溶酶体中,通过生物体的 组织中的分子蛋白,溶酶体中的元素铁可被储存或者 进一步合成血红蛋白而降解,从而始终维持生物体内 的铁平衡,本研究用透射电子显微镜对 SPIO 标记细 胞的超微结构进行了观察,结果显示内吸收的 SPIO 主要位于细胞质区域的囊泡和溶酶体内,并且标记后 的细胞结构基本完整,细胞器未见明显破坏,进一步说 明了 SPIO 的标记是安全有效的。

本研究结果显示这种由高温多元醇法合成的新型 SPIO 在适当孵育浓度和时间下可以安全、快速地标记 ADSCs。这种具有固定表面正电荷的 PEG/PEI 修饰 的新型 SPIO 标记效果要远远比既往商用的 SPIO 快速有效,并随着孵育浓度的增加,细胞内的铁含量增加,可作为一种新型的磁性标记物用于干细胞标记;而 具有固定表面零电荷的 PEG/PVP 修饰的 SPIO 比起 既往商用的 SPIO 并无明显优势,说明表面电荷在细 胞标记中占有极其重要的角色。

参考文献:

- [1] Albukhaty S, Naderi-Manesh H, Tiraihi T. In vitro labeling of neural stem cells with poly-L-lysine coated super paramagnetic nanoparticles for green fluorescent protein transfection[J]. Iranian Biomedical J,2013,17(2):71.
- [2] Khurana A, Nejadnik H, Chapelin F, et al. Ferumoxytol: a new, clinically applicable label for stem-cell tracking in arthritic joints with MRI[J]. Nanomedicine, 2013,8(12):1969-1983.
- [3] 杨文胜,高明远,白玉白.纳米材料与生物技术[M].北京:化学工业出版社,2005:53-177.
- [4] Jo J, Aoki I, Tabata Y. Design of iron oxide nanoparticles with different sizes and surface charges for simple and efficient labeling of mesenchymal stem cells[J]. J Controlled Release, 2010, 142 (3):465-473.
- [5] Liu G, Yang H, Zhang XM, et al. MR imaging for the longevity of mesenchymal stem cells labeled with poly-L-lysine-Resovist complexes[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2010, 5(2):53-58.
- [6] Zhao F,Zhang B, Wang J, et al. Synthesis and properties of magnetite nanoparticles coated with poly (ethylene glycol) and poly (ethylene imine)[J]. J Nanosci Nanotechnol,2013,13(10):6793-6797.
- [7] Ammar S, Helfen A, Jouini N, et al. Magnetic properties of ultrafine cobalt ferrite particles synthesized by hydrolysis in a polyol medium Basis of a presentation given at Materials Discussion No.
 3, 26-29 September, 2000, University of Cambridge, UK[J]. J Materials Chemistry, 2001, 11(1): 186-192.

- [8] Brus C, Petersen H, Aigner A, et al. Physicochemical and biological characterization of polyethylenimine-graft-poly (ethylene glycol) block copolymers as a delivery system for oligonucleotides and ribozymes[J]. Bioconjugate Chemistry, 2004, 15 (4): 677-684.
- [9] Lu X, Niu M, Qiao R, et al. Superdispersible PVP-coated Fe₃O₄ nanocrystals prepared by a "One-Pot" reaction? [J]. J Physical Chemistry B,2008,112(46):14390-14394.
- [10] Kim TH, Kim JK, Shim W, et al. Tracking of transplanted mesenchymal stem cells labeled with fluorescent magnetic nanoparticle in liver cirrhosis rat model with 3T MRI[J]. Magn Reson Imaging, 2010, 28(7): 1004-1013.
- [11] Thorek DL, Tsourkas A. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells[J]. Biomaterials, 2008, 29(26): 3583-3590.
- [12] Mailänder V, Lorenz MR, Holzapfel V, et al. Carboxylated superparamagnetic iron oxide particles label cells intracellularly without transfection agents[J]. Mol Imaging Biol, 2008, 10(3): 138-146.
- [13] Suh JS, Lee JY, Choi YS, et al. Efficient labeling of mesenchymal stem cells using cell permeable magnetic nanoparticles[J]. Biochem Bioph Res Com, 2009, 379(3):669-675.
- [14] Ittrich H, Lange C, Tögel F, et al. In vivo magnetic resonance imaging of iron oxide-labeled, arterially-injected mesenchymal stem cells in kidneys of rats with acute ischemic kidney injury: Detection and monitoring at 3T[J]. J Magn Reson Imaging, 2007, 25 (6):1179-1191.
- [15] Barrow M, Taylor A, Murray P, et al. Design considerations for the synthesis of polymer coated iron oxide nanoparticles for stem cell labelling and tracking using MRI[J]. Chem Soc Rev, 2015, 44 (19):6733-6748.

(收稿日期:2015-10-29 修回日期:2016-01-11)