

· 实验研究 Experiment research ·

诱导后大鼠胰岛素分泌细胞超顺磁化氧化铁颗粒-多聚左旋赖氨酸体外标记后生物活性研究

王维英, 邓 钢, 李爱梅, 孙军辉

【摘要】 目的 比较超顺磁化氧化铁颗粒-多聚左旋赖氨酸(SPIO-PLL)标记与未标记诱导后大鼠胰岛素分泌细胞的生物活性,探讨两者 MRI 成像表现。方法 分离培养大鼠骨髓间质干细胞(BMSC),经二期方案诱导成胰岛素分泌细胞,SPIO-PLL 标记细胞,普鲁士蓝染色显示细胞内铁,放射免疫分析法测定标记及未标记细胞的胰岛素分泌情况;同时采用临床应用型 1.5 T MR 仪对两组细胞群进行 T_1WI 、 T_2WI 、 T_2^*WI 3 个序列成像。结果 普鲁士蓝染色显示标记细胞蓝色铁颗粒位于细胞内。标记后的细胞能分泌胰岛素,经统计学分析分泌量与未标记细胞无显著性差异。标记后的细胞在以 T_2^*WI 序列信号降低最明显,信号强度变化率最大。结论 SPIO-PLL 可以有效标记诱导后大鼠胰岛素分泌细胞,且对其生物学活性无明显影响,临床应用型 1.5 T MR 仪可对标记细胞群进行体外成像。

【关键词】 间质干细胞,胰岛素分泌细胞,磁共振成像,标记

中图分类号:R587 文献标识码:A 文章编号:1008-794X(2007)02-0104-05

Characterization of biophysical properties of insulin-producing cells labeled with SPIO-PLL *in vitro*

WANG Wei-ying, DENG Gang, LI Ai-mei, SUN Jun-hui. Laboratory of Molecular Imaging, Department of Radiology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 **Objective** To evaluate the biophysical properties of insulin-producing cells labeled and unlabeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and poly-L-lysine (SPIO-PLL) *in vitro*, and then monitor cellular imaging with 1.5 T MR. **Methods** BMSCs were isolated from tibia and femur of 6 ~ 8 weeks normal Sprague-Dawley rats, purified on the basis of their ability to adhere to the matrix, and expanded through their self-renewal. Two-step strategy was adopted with BMSCs induced into insulin-producing cells. After that, the cells were incubated with SPIO-PLL. Prussian blue stain was employed for identifying intracellular irons. Radioimmunity assay was used to measure the insulin secretion by the labeled and unlabeled cells, and later on underwent MR imaging with T_1WI 、 T_2WI 、 T_2^*WI sequences. **Results** Intracytoplasmic nanoparticles were stained with Prussian blue possessing insulin-producing cells labeled with SPIO-PLL. The amount of insulin secreted by the labeled and unlabeled cells had no statistical significant difference. The signal intensity of labeled cells decreased significantly on T_2^*WI , as well as the stronger proportional variations for signal intensity. **Conclusion** Insulin-producing cells can be labelled effectively with SPIO-PLL and be imaged by 1.5 T MRI. (J Intervent Radiol, 2007, 16: 104-108)

【Key words】 Mesenchymal stem cell, Insulin-producing cell, Magnetic resonance image, Label

胰岛移植(islet transplantation)已成为治疗 1 型糖尿病的有效方法^[1],但供体细胞缺乏及异体细胞免疫排斥反应限制了其在临床推广,对此有人提出了个体化胰岛方案^[2],即应用自身细胞。骨髓间充质干细胞(BMSC)具有多向分化潜能,在体外可诱导

分化为胰岛素分泌细胞,且取材方便,可望解决胰岛移植的上述两项重大难题。但是细胞移植入体内后如何在活体状态下评价移植细胞的分布、增殖、迁移等问题有待解决。分子影像学可活体示踪移植细胞^[3],尤其是随着 MR 对比剂的不断开发,MR 示踪技术已成为研究热点。目前研究较多的 MR 对比剂是氧化铁纳米粒子,如超顺磁性氧化铁颗粒(superparamagnetic iron oxide, SPIO)或超小顺磁性

作者单位 210009 南京 东南大学附属中大医院放射科 东南大学分子影像实验室

通信作者 邓 钢

氧化铁颗粒 (ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO)。本实验室已应用 SPIO 及多聚左旋赖氨酸(PLL)复合体成功标记脐间质干细胞及骨髓间质干细胞并在 MR 下显像^[4-5]。本实验在此基础上用 SPIO-PLL 标记诱导后悬浮生长的胰岛素分泌细胞,并在 1.5 T 临床应用型 MR 仪下对细胞群进行成像,为动物实验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康 Sprague-Dawley (SD)大鼠 5 只,清洁级,6~8 周龄,体重 120 g 左右,雌雄不限,由东南大学医学院实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培养液、B27、胰酶(美国 Gibco 公司);尼克酰胺、双硫腙粉(美国 Sigma 公司);碱性成纤维生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、肝细胞生长因子(HGF)(美国 Peprotech 公司); β 细胞调节素(Betacellulin)、活化素 A (Activin A)(美国 R&D systems);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所);大鼠胰岛素放免试剂盒(北京科美东雅生物技术有限公司);碱性磷酸酶染色试剂盒(南京建成生物工程研究所);普鲁士蓝染色试剂盒(上海元象医疗器械有限公司);SPIO-PLL(由东南大学生物科学与医学工程系提供)。

1.1.3 主要设备 细胞培养瓶、多孔培养板(美国 Corning 公司);共培养皿(德国 Greiner 公司);二氧化碳培养箱(德国 Heraeus 公司);倒置相差显微镜(德国 Zeiss 公司);净化工作台(吴江市生化净化设备厂);自动放免仪(中国科大中佳公司);1.5 T 磁共振仪(Philips 公司, Eclipse 机型)。

1.2 实验方法

1.2.1 SD 大鼠 BMSC 分离、培养及纯化 无菌条件下取大鼠胫骨及股骨,用 LG-DMEM 培养液冲洗骨髓腔 1~2 次,离心后获得细胞,加含 10% 胎牛血清(FBS)的 LG-DMEM 培养液 5 ml,调节细胞浓度至 $(1 \sim 2) \times 10^6/\text{ml}$,接种于 25 cm^2 塑料培养瓶内,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。细胞铺满瓶底约 80% 左右时,用胰酶以 1:2 消化传代,并记为 P₁代,余类推,当细胞传至 P₄₆时可用于诱导。培养过程中用倒置相差显微镜对细胞进行动态观察。

1.2.2 体外诱导大鼠 BMSC 向胰岛样细胞团分化

取 P₄₆ BMSC 消化离心,按 $1 \times 10^6/\text{孔}$ 密度接种于 6 孔板中,每孔加 3 ml 诱导液 1 (含 20 ng/ml

bFGF, 10 ng/ml EGF 及 2% B 27 的 DMEM/F 12 培养液)。经诱导液 1 培养 6 d 后,去除旧培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗细胞 1 次,添加 3 ml 诱导液 2 (含 10 ng/ml β 细胞调节素, 10 ng/ml HGF, 10 ng/ml 活化素 A 和 10 mmol/L 尼克酰胺及 2% B 27 的无血清 HG-DMEM 培养液),继续培养 6~8 d。

1.2.3 细胞鉴定

1.2.3.1 碱性磷酸酶染色 P₄代 BMSC 细胞爬片后,参照碱性磷酸酶染色试剂盒方法操作。

1.2.3.2 双硫腙染色:取 100 mg 双硫腙粉末溶于 10 ml 二甲基亚砜(DMSO)中,过滤, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将一期诱导及二期诱导后的细胞团用 PBS 洗 2 遍后,加 PBS 1 ml 和双硫腙液 10 μl ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中 15 min, PBS 洗 2 遍,用显微镜观察细胞着色情况。

1.2.4 SPIO-PLL 标记细胞团 将 SPIO-PLL 加入二期诱导后的胰岛素分泌细胞的培养液中,铁终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$,浓度参照贴壁细胞^[6],置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内孵育 24 h。随后将细胞移入共培养皿中, PBS 反复冲洗过滤掉游离的氧化铁纳米粒子。

1.2.5 普鲁士蓝染色

1.2.5.1 细胞团染色:未标记与标记后的细胞团分别加含 10% FBS 的 LG-DMEM 培养液 3 ml 于 6 孔板内培养 24 h,使其贴壁生长。去除培养液, 4% 戊二醛固定 10 min, PBS 洗 2 次, 2% 亚铁氰化钾及 6% 盐酸等量混合溶液孵育 30 min,三蒸水洗 3 次, 1% 中性红复染 2~3 min,三蒸水洗 3 次。

1.2.5.2 单个细胞染色:将标记与未标记的细胞团吹散成单个细胞,分别加含 10% FBS 的 LG-DMEM 培养液 3 ml 于 6 孔板内培养 24 h,使细胞贴壁, PBS 洗涤 2 次, 2% 亚铁氰化钾及 6% 盐酸等量混合溶液孵育 30 min,三蒸水洗 3 次, 1% 中性红复染 1~2 min,三蒸水洗 3 次。若铁颗粒位于细胞质内则染成蓝色,细胞核则染成红色。

1.2.6 放射免疫分析法检测胰岛素分泌水平 经二期诱导后的未标记与标记细胞团用 PBS 洗 2 遍后,置 6 孔板中,各分 5 孔,每孔约 100 个细胞团,直径约 50~300 μm 。以含 16.7 mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F 12 培养液 3 ml 孵育 2 h,分别收集各孔上清液 0.5 ml,采用放射免疫分析法检测上清中的胰岛素含量。结果分析用配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

1.2.7 MR 细胞的体外成像 将标记细胞、未标记细胞团各 200 个左右重悬于 1% 琼脂糖 0.5 ml 的 Ependoff 管中,另外 2 支 Ependoff 管内为培养液和

PBS。进行细胞悬液的 MR 成像 采用 1.5 T MR 仪 表面线圈,内径 12.7 cm,视野(FOV)80 mm × 80 mm;激励次数 2;层厚 2.5 mm,矩阵 256 × 256。测量标记细胞团(SI_标)与未标记细胞团(SI_{未标})三个序列中的信号强度(Signal Intensity SI),计算信号强度变化率 $\Delta SI = (SI_{\text{标}} - SI_{\text{未标}}) / SI_{\text{未标}} \times 100\%$,ROI 取 20 mm²。

成像序列 ①SE 序列 T₁WI,TR 300.0 ms,TE 9.8 ms ②快速自旋回波(FSE)序列 T₂WI,TR 2246 ms,TE 96 ms,回波链 16 或 32 ③梯度回波序列(GRE)T₂*WI,TR 467 ms,TE 20.1 ms,反转角 30°。

2 结果

2.1 BMSC 形态学观察

大鼠骨髓分离到的细胞呈圆球状分散悬浮于培养液中,24 h 即可见有贴壁的间质样细胞,并有集落形成,同时有大量的骨样细胞混杂。72 h 换液去除非贴壁细胞后留下来的细胞大多贴壁生长。传至 P₃ 代后,大部分其他细胞逐渐被去除,剩下形态较为单一的成纤维样 BMSC(图 1)。

2.2 BMSC 诱导分化过程中的形态改变

用诱导液 1 培养诱导 BMSC 过程中,由于每孔

细胞密度较大,24 h 即可见细胞成簇状生长,48 h 大部分即已成团悬浮生长(图 2),大小不一,平均 150 μm。诱导 7 d 后换用诱导液 2,形态同前近似,类似于胰岛细胞。

2.3 细胞鉴定

2.3.1 碱性磷酸酶染色 P₄ 代 BMSC 染色呈阴性,细胞质内未见棕黄色颗粒(图 3)。

2.3.2 双硫腙染色 二期诱导后的细胞团双硫腙染色呈阳性,在倒置相差显微镜下观察细胞团呈棕红色(图 4),而一期诱导的细胞团则不着色,表明二期诱导后的细胞内富含锌离子,证实了胰岛 β 细胞的存在。

2.4 标记后细胞内铁鉴定

细胞普鲁士蓝染色后观察,几乎每个标记细胞团均成蓝色(图 5),而未标记细胞团内未见蓝色颗粒。且将细胞团吹散成单个细胞再行普鲁士蓝染色,可见标记细胞蓝色颗粒位于细胞质内(图 6),而未标记细胞质内未见蓝色颗粒。

2.5 放射免疫分析法检测胰岛素分泌水平

放射免疫分析法检测未标记细胞团与标记细胞团上清液中胰岛素含量分别为 (391.930 ± 25.474) mIU/ml、 (393.748 ± 31.757) mIU/ml, $t = 0.11$, $P =$

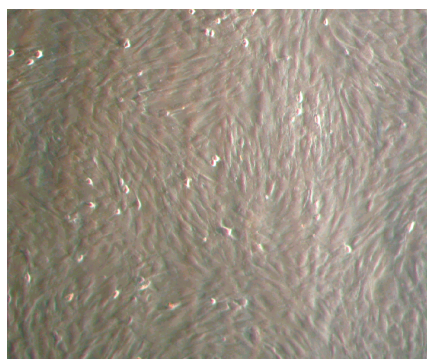


图 1 大鼠 BMSC 呈形态较为单一的成纤维样细胞(P₃ × 100)

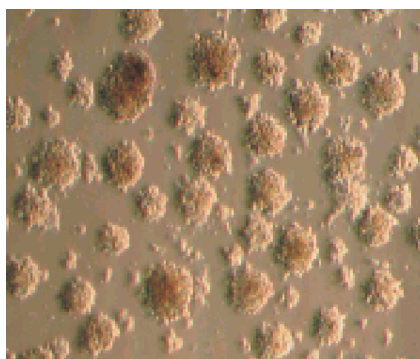


图 2 一期诱导 2 d, 细胞已聚集成团悬浮生长(× 50)

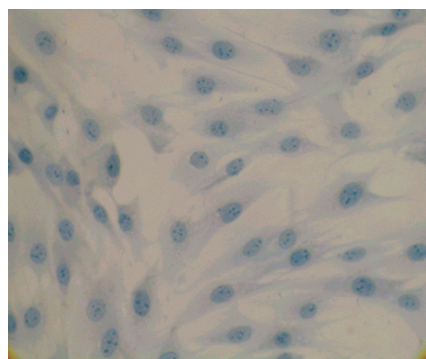


图 3 大鼠 BMSC 碱性磷酸酶染色阴性(P₄, × 400)

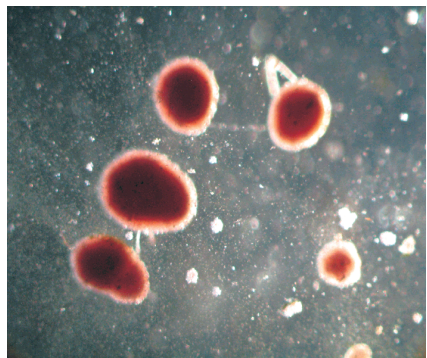


图 4 二期诱导后细胞团双硫腙染色呈深红色(× 50)

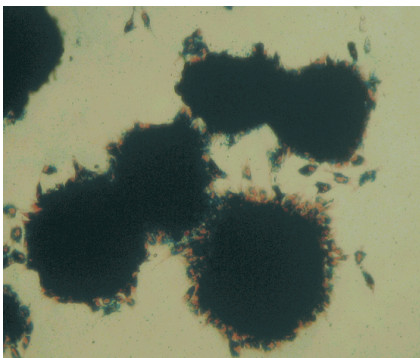


图 5 诱导后胰岛素分泌细胞团 SPIO-PLL 标记后的普鲁士蓝染色,可见细胞团内蓝色铁颗粒(× 100)

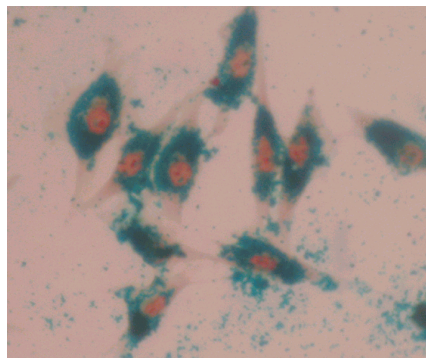


图 6 将标记细胞团吹散成单个细胞后的普鲁士蓝染色,可见蓝色铁颗粒位于细胞质内(× 400)

0.917, 两者数值无统计学差异。

2.6 MR 成像

标记细胞团在 T_1WI 、 T_2WI 、 T_2^*WI 3 个序列中成像, 以 T_2^*WI 信号降低最明显(图 7~11)。测量标记细胞团与未标记细胞团在 3 个序列中的信号强度 ΔSI 在 T_1WI 、 T_2WI 、 T_2^*WI 3 个序列分别为 -22.6%、-39.2% 和 -96.2%, 可见标记细胞团在 T_2^*WI 序列上信号强度变化率最大。



图 7 细胞 MR 横断面 T_2^*WI 成像(从左到右依次为培养液、PBS、未标记细胞、标记细胞)标记细胞的信号明显降低



图 8 细胞 MR 横断面 T_2WI 成像(次序同前)标记细胞的信号较其他组略低



图 9 细胞 MR 横断面 T_1WI 成像(次序同前)标记细胞的信号无明显差异

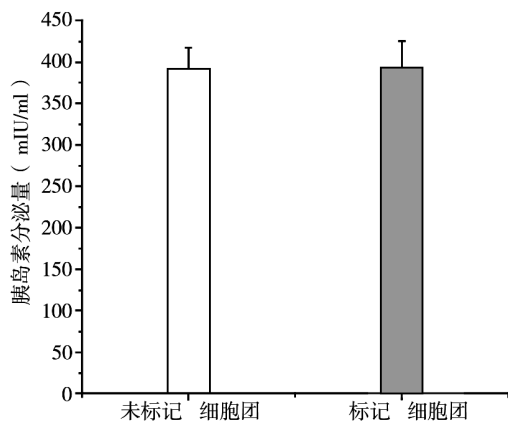


图 10 未标记细胞团与标记细胞团的胰岛素分泌量比较

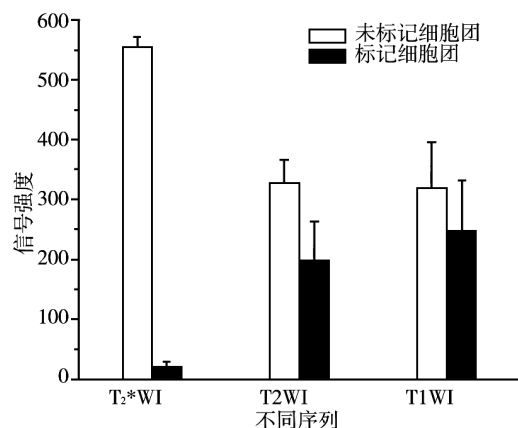


图 11 未标记细胞团与标记细胞团在不同成像序列上的信号强度比较

3 讨论

本实验组前期已成功将大鼠 BMSC 诱导为胰岛素分泌细胞并做了部分鉴定^[7]。本研究论述 SPIO-PLL 标记悬浮生长的胰岛素分泌细胞的生物活性, 并在 1.5 T MR 仪下对细胞群进行成像, 从而为胰岛素分泌细胞移植后的活体 MR 监测提供可能。

3.1 细胞来源

BMSC 是具有多向分化潜能的干细胞, 已成为干细胞治疗学的重要分支。针对目前胰岛移植所面临的种种难题, BMSC 因来源丰富, 将其诱导成胰岛素分泌细胞, 可以为自体胰岛移植开辟有利的前景。而采用在体外先诱导成胰岛素分泌细胞后再移植入体内, 避免了直接将干细胞移植入体内靠其自身环境分化的不确定性^[8]。

碱性磷酸酶(AKP)是成骨细胞的一种标志物。 P_0 BMSC 由于混有少量成骨细胞而 AKP 染色部分呈阳性, P_3 开始染色即已呈阴性, 说明 BMSC 已趋于纯化, 因而诱导常选用 $P_4 \sim P_6$ 。

双硫腙是锌离子螯合剂, 能与 β 细胞中富含的锌离子结合而使细胞呈深红色, 因此双硫腙染色常用来挑选和计数胰腺中的胰岛细胞, 并认为其是鉴定由胚胎干细胞分化出的胰岛细胞的较好方法^[9]。

3.2 细胞的标记

活体监测移植细胞是今后干细胞治疗向临床推广的前提之一。影像学示踪方法有多种, 其中 MR 成像的优点是高分辨率, 多序列、多角度成像, 可很好显示软组织的解剖结构, 特别是用于标记的 MR 对比剂的开发, 使其成为当今主要研究手段。SPIO 直径 30 ~ 1 000 nm, USPIO 直径更小, 平均 10 nm 左右。这种氧化铁纳米粒子中心是氧化铁, 外周由葡聚糖包裹, 对外加磁场敏感性高, 在较弱的磁场中, 磁化中心即按外加磁场排列获得巨大的磁矩, 撤除外加磁场后无净剩磁, 能产生 T2 负性效应。其特点是粒径小, 穿透力强, 且弛豫率约为同样条件下 Gd^{3+} 的 7 ~ 10 倍, 在很低浓度(nmol 级)即可在 MR 上形成对比, 且这种铁代谢后进入血浆铁池, 与红细胞血红蛋白结合参与人体正常铁代谢途径^[10]。随着研究的深入, 为进一步提高细胞的标记率, 将氧化铁纳米粒子与其他物质螯合, 通过修饰来改变粒子的电性, 如连接单克隆抗体、肽链或带正电荷的转染剂。其中正电荷转染剂有多聚左旋赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)^[6]、鱼精蛋白硫酸盐(protamine sulfate, PS)^[11]、繁枝体(dendrimer)^[12], 从而克服了氧化铁纳米粒子及细胞膜都带负电荷相互排斥的影

响,明显提高了标记率。

本实验所用的 SPIO 直径 20 nm 左右,螯合了 PLL,使粒子更容易穿越细胞膜进入细胞质内。实验过程中发现细胞团直径在 100 ~ 200 μm 的 SPIO-PLL 标记率较高,大于 300 μm 的反而不容易标记,这可能是细胞团直径越大,细胞之间联系越紧密,铁颗粒反而难被单个细胞内吞。

由于我们所标记的胰岛素分泌细胞是悬浮生长的,不象贴壁细胞可通过冲洗去除多余的氧化铁纳米粒子,所以实验中采用孔径为 8 μm 的共培养皿来过滤去除多余的氧化铁纳米粒子,尽量减少了游离的氧化铁纳米粒子对实验结果造成的影响。

普鲁士蓝染色可见细胞团成蓝色,为证明氧化铁纳米粒子被内吞入细胞质内而非仅浮于细胞团表面,将细胞团吹散成单个细胞后贴壁培养,再进行普鲁士蓝染色,结果充分说明纳米粒子位于细胞质内。

细胞团从一期诱导已开始分泌胰岛素,将标记与未标记细胞团用含 16.7 mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F12 培养液培养,一方面模拟了体内高血糖的环境,另一方面也考虑葡萄糖的浓度在诱导分化过程中的作用^[13],随后用放射免疫分析法检测上清液中的胰岛素的含量,发现两者分泌胰岛素的量无统计学差异,说明氧化铁纳米粒子标记并未对诱导的细胞产生明显生物学功能的影响。

3.3 MR 扫描

近期研究表明,氧化铁纳米粒子标记后的细胞群能在 1.5 T MR 下体外成像^[14-15]。胰岛素分泌细胞虽然是悬浮生长的细胞团,但在 MR 下也能成功显像,标记后的细胞团在 $T_1\text{WI}$ 、 $T_2\text{WI}$ 、 $T_2^*\text{WI}$ 3 个序列中均有信号改变,其中以 $T_2^*\text{WI}$ 的信号强度变化率最大,这是由于 $T_2^*\text{WI}$ 对磁化率的差异更敏感,铁引起的磁敏感效应更大。

这些体外实验说明了 SPIO-PLL 可以有效标记诱导成的胰岛素分泌细胞,在临床应用型 1.5 TMR 仪上可以显像。但细胞在体外环境与体内复杂的微环境下生存还是有区别的,我们将继续进行动物实验,如建立大鼠糖尿病模型,将诱导后的细胞移植入模型体内,观察症状及一些生化指标有无改善,以确定所诱导的细胞是否具备治疗作用。

seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen [J] N Engl J Med, 2000, 343: 230 - 238.

- [2] Wang J, Song LJ, Gerber DA. A model utilizing adult murine stem cells for creation of personalized islets for transplantation [J] Transplant Proc, 2004, 36: 1188 - 1190.
- [3] Weissleder R. Molecular imaging: exploring the next frontier [J] Radiology, 1999, 212: 609 - 614.
- [4] 居胜红,滕皋军,毛曦,等. 脐血间充质干细胞磁探针标记和 MR 成像研究 [J] 中华放射学杂志, 2005, 39: 101 - 106.
- [5] 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 [J] 中华放射学杂志, 2006, 40: 144 - 148.
- [6] 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 [J] Radiology, 2003, 229: 838 - 846.
- [7] 李爱梅,邓钢,王维英,等. 大鼠骨髓间质干细胞体外诱导分化为胰岛素分泌细胞的实验研究 [J] 解剖学报, 2006, 37: 321 - 325.
- [8] Choi JB, Uchino H, Zuma KA, et al. Little evidence of trans-differentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells [J] Diabetologia, 2003, 46: 1366 - 1374.
- [9] Shirol A, Smith AG, Thomson C, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating diathione [J] Stem Cells, 2002, 20: 284 - 290.
- [10] Weissleder R, Stark DD, Engelstad BL, et al. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity [J] AJR, 1989, 152: 167 - 173.
- [11] 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: 1217 - 1223.
- [12] Bulte JW, Douglas T, Witwer B, et al. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells [J] Nat Biotechnol, 2001, 19: 1141 - 1147.
- [13] Roche E, Meda P, Bossie S, et al. Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1) [J] J Biol Chem, 1997, 271: 3091 - 3098.
- [14] Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, et al. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction [J] Circulation, 2003, 107: 2290 - 2293.
- [15] Matuszewski L, Persigehl T, Wall A, et al. Cell tagging with clinically approved iron oxides: feasibility and effect of lipofection, particle size, and surface coating on labeling efficiency [J] Radiology, 2005, 235: 155 - 161.

(收稿日期 2006-11-29)

[参考文献]

- [1] Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in