

· 实验研究 Experiment research ·

铁羧葡胺标记猪间充质干细胞的体内外磁共振成像研究

黄浙勇, 葛均波, 杨 姝, 张少衡, 黄榕翀, 金 航, 曾蒙苏,
孙爱军, 钱菊英, 邹云增

【摘要】 目的 探讨铁羧葡胺-多聚赖氨酸复合物标记猪骨髓间充质干细胞(MSC)的体外和活体心脏内 MR 成像的特点。方法 分离培养猪 MSC, 用含铁羧葡胺-多聚赖氨酸复合物标记细胞 24 h。分别于标记后 0、4、8、12、16、20 d 行普鲁士蓝染色观察细胞内铁, 原子吸收分光光度仪测定细胞内含铁量, 锥虫蓝排除试验检测细胞活力。对不同时间点、不同细胞数的磁标记干细胞进行 1.5 T MR 仪体外成像, 并对植入猪心肌内的标记细胞进行体内 MR 成像。结果 ① MSC 标记后见胞质中大量普鲁士蓝着色颗粒, 标记率达 100%, 铁离子含量平均为 $(13.13 \pm 2.30) \mu\text{g}/\text{细胞}$, 随细胞的分裂增殖, 细胞内铁离子含量逐渐减少, 16 d 时铁离子含量下降到 $(0.68 \pm 0.20) \mu\text{g}/\text{细胞}$, 接近标记前水平 $[(0.21 \pm 0.06) \mu\text{g}/\text{细胞}]$ ($P > 0.05$)。干细胞磁标记后各时间点的锥虫蓝拒染率与未标记细胞无统计学差异 ($P > 0.05$)。② 3 种成像序列中 GRE T_2^* WI 信号改变最为明显, 成像细胞数量越多, 信号强度变化越明显。 1×10^6 个细胞进行 MR 成像, 发现随着标记后体外培养时间延长, T_2^* WI 磁标低信号逐渐消失, 12 d 以后信号强度和标记前无差异 ($P > 0.05$)。体外 MR 成像最少能检测到 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个标记的猪 MSC。③ 标记细胞心肌内移植后 1 周 MR 成像显示低信号区。结论 应用铁羧葡胺-多聚赖氨酸复合物标记猪 MSC 安全、高效, 体外 MR 信号强度能一定程度上反映磁标记细胞的数量及增殖情况, 1.5 T 临床 MR 成像仪可对植入心脏的磁标记细胞进行活体显像示踪。

【关键词】 超顺磁性氧化铁, 间充质干细胞, 磁共振成像, 铁羧葡胺

中图分类号 R541 文献标识码 A 文章编号 1008-794X(2007)02-0115-07

In vitro and in vivo MR imaging of SHU 555A-labelled swine bone marrow mesenchymal stem cells

HUANG Zhe-yong, GE Jun-bo, YANG Shan, ZHANG Shao-heng, HUANG Rong-chong, ZENG Meng-su, JIN Hang, SUN Ai-jun, QIAN Ju-ying, ZOU Yun-zeng. Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 **Objective** To detect the feasibility of magnetically labeled swine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) with SHU 555A combined with poly-L-arginine (PLL), under MR imaging *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Swine mesenchymal stem cells were isolated and culture-expanded 3 passages *in vitro*, then magnetically labeled by incubation with SHU 555A ($25 \mu\text{g Fe/ml}$, Resovist, Schering) for 24 hours with 750 ng/mL poly-L-lysine (PLL; average MW 275 kDa) added 1 hour before incubation. Cellular iron incorporation and detention at 0 d, 4 d, 8 d, 12 d, 16 d, 20 d after labeling was qualitatively assessed using Prussian blue and quantified at atomic absorption spectrometry. Cell viability was assessed by trypan-blue exclusion test. Cell suspensions underwent MR imaging with T_1 - and T_2 -weighted spin-echo and fast field-echo sequences on a clinical 1.5 T MR system. At last, 1×10^6 SHU 555A labeled and unlabeled MSCs were transextracardially implanted into the infarcted and normal myocardium approximately 2 week following the ligation of left anterior descending coronary artery in 1 swine respectively, and finally performed 1.5-T MRI within 1 week after infarction. **Results** ① Intracytoplasmic particles stained with Prussian blue stain were detected for all cells with mean cellular iron content of $(13.13 \pm 2.30) \text{ pg per cell}$. With division of stem cells, the stained particles decreased gradually with iron content $(0.68 \pm 0.20) \text{ pg per cell}$ at 16 days after labeling,

基金项目: “十五”国家科技攻关计划项目(2004BA714B05-2);上海市科委优秀学科带头人计划(03XD14010)

作者单位: 200032 上海 复旦大学附属中山医院心内科/上海市心血管病研究所(黄浙勇、葛均波、张少衡、黄榕翀、孙爱军、钱菊英、邹云增);放射科(杨 姝、金 航、曾蒙苏)

通讯作者: 葛均波

approximately to the prelabeled baseline values. (0.21 ± 0.06) pg per cell ($P > 0.05$). The viability of the labeled cells at various time points were not significantly different with that of nonlabeled cells ($P > 0.05$). ② MR images showed signal intensity changed most obviously in T_2^* WI *in vitro*. The percentage change of signal intensity increased with increasing cell numbers, and decreased with the time. As few as $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ cells could be detected by using this approach. ③ Two injected sites containing MR-MSCs were detected *in vivo*, presenting as low signal intensity areas with the T_2^* WI scanning sequence. **Conclusion** Swine bone marrow MSCs can be labeled with SHU555A-PLL and depicted with a standard 1.5-T MR imager *in vitro* and *in vivo*. (J Intervent Radiol, 2007, 16: 115-121)

【Key words】 Small superparamagnetic iron oxides (SPIO); Mesenchymal stem cells (MSCs); Magnetic resonance imaging (MRI); SHU 555A

10 年来, 干细胞移植被广泛用于缺血性心脏病、终末期心力衰竭、糖尿病、中枢神经系统退行性疾病等细胞丢失性疾病的动物实验甚至临床试验性治疗^[1], 但移植后干细胞的分布、迁徙、分化及转归等生物学行为一直是争论的话题。传统上多采用荧光染料或染色体等作为标志物对干细胞移植进行示踪, 但只能在离体状态下通过组织学检查来实现。近年来分子影像学和无创性活体示踪技术获得一定的发展, 其中超顺磁性物质标记干细胞后进行 MR 显像和示踪具备空间分辨力更佳、可长期示踪等优点, 似具有更大前景^[2]。加之近年来 MR 对比剂超顺磁性氧化铁颗粒 (SPIO) 研究取得进展, 利用 SPIO 作为分子探针标记干细胞并进行移植后的 MR 活体示踪是可能的。

本实验采用铁羧葡胺 (SHU555A, 商品名 Resovist) 纳米微粒标记猪骨髓间充质干细胞 (MSC), 在确定标记效率和安全性的基础上, 探讨了磁标记干细胞的体外 MR 检测阈值、MR 信号与细胞数量及细胞增殖的关系, 并对植入心脏磁标细胞的 MR 活体显像示踪进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂及仪器

淋巴细胞分离液 (加拿大 Cedarlane 公司), DMEM 培养基、胎牛血清 (Gibco 公司), SHU555A (德国 Schering 公司), 多聚赖氨酸 (PLL, 美国 Sigma 公司, 平均分子量 275 ku), 亚铁氰化钾、中性红 (美国 Sigma 公司), 多聚甲醛、磷酸盐缓冲液 (PBS, 上海钰森生物技术有限公司)。水浴箱 (德国 Hettich 公司), 倒置相差显微镜 (TS 100, Nikon), Thermo E. IRIS Duo ICP 发射光谱仪, MR 扫描仪 Magnetom Avanto 1.5 T (Siemens 公司)。

1.2 细胞分离、培养

无菌条件下猪髂后上嵴多点抽取骨髓液 40 ~

80 ml, 置于含肝素的 50 ml 离心管中混匀, 200 目滤网过滤后, 室温 2500 转/min 离心 5 min, 平头吸管反复抽吸吹打制成单细胞悬液, 将骨髓液沿壁轻轻叠加到密度 1.077 g/ml 的淋巴细胞分离液上, 4℃ 2000 转/min 梯度离心 30 min, 吸出中间 2 ~ 3 mm 厚的白绒层, 离心洗涤, 加入完全培养基 (DMEM + 10% 胎牛血清 + 双抗含 100 mg/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素) 中充分混匀, 并将分离得的细胞接种于 75 cm² 塑料培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的孵箱中进行培养, 72 h 后更换培养液, 弃掉未贴壁细胞, 以后每 48 ~ 72 h 全量换液。细胞长到 80% 融合时用 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化并按照 1:2 比例传代, 取第 3 代细胞作磁标记。

1.3 细胞磁标记

将 SHU555A 和非特异性转染剂 PLL (平均分子量 275 ku) 用无血清的 DMEM 培养液稀释, 制成终浓度为 25:0.75 μg/ml 的 SHU555A-PLL 标记培养液, 室温下轻摇混合 60 min 形成 SHU555A-PLL 复合物。然后用 SHU555A-PLL 复合物全量换液猪 SMCs, 置于 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。

1.4 普鲁士蓝染色

取少许标记后 0、4、8、12、16 和 20 d 细胞以及未标记细胞沉淀, 经 PBS 洗涤 3 次 (去除细胞外铁) 后, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 蒸馏水洗涤 3 次, Perl 反应液 [2% K₃(CN)₆ + 6% HCl] 中作用 30 min, 蒸馏水洗涤 3 次, 1% 核固红复染 3 min, 蒸馏水洗去多余的核固红, 显微镜下观察结果。

1.5 细胞铁浓度测定

取标记后不同时间点的细胞各 1×10^5 个, 离心沉淀, 110℃ 干燥过夜, 加入 500 μl 高氯酸-硝酸混合物 (3:1), 60℃ 消化 3 h 以上, 以彻底破坏细胞。原子吸收分光光度计测定铁离子浓度, 以 pg Fe/细胞表示。每种条件均测定 3 个样品。

1.6 锥虫蓝排除试验

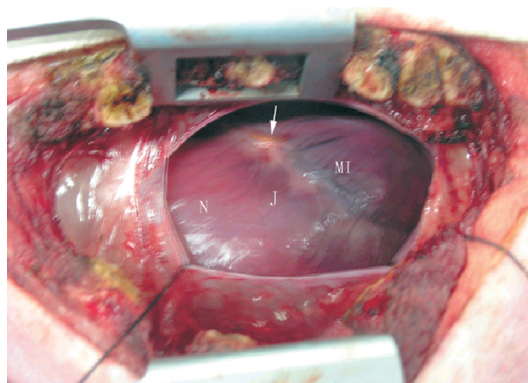
取标记后 0、4、8、12、16 和 20 d 细胞以及未标记细胞各 5 μ l 悬液,分别与 0.4% 锥虫蓝溶液 5 μ l 混合,1 min 后滴入细胞计数板,镜下观察,计数 100 个细胞。细胞活力(锥虫蓝拒染率) = 染色阴性细胞数/100 个细胞 \times 100%。

1.7 细胞 MR 体外成像

用 0.25% 胰蛋白酶消化后收集将未标记细胞、不同数量标记细胞 (1×10^6 、 5×10^5 、 1×10^5 、 5×10^4 、 1×10^4) 和标记后培养不同时间的细胞(标记后培养 4、8、12、16 和 20 d),分别重悬于 0.3% 琼脂糖 0.5 ml 的 EP 管中,冷却凝胶形成后 MR 成像。另外将 150 μ l 含不同细胞量(1×10^6 、 5×10^5 、 1×10^5 、 5×10^4 、 1×10^4 、 5×10^3 、 1×10^6 未标记细胞)的细胞沉淀注入凝胶 MR 成像,判断体外铁标细胞检测阈值。采用 Magnetom Avanto 1.5 T(Siemens 公司),头线圈;视野(FOV)90 cm^2 ;激励次数 2 ~ 4;层厚 2 mm;矩阵 256×160 。成像序列 ① SE 序列 T_1 WI,重复时间(TR)450 ms,回波时间(TE)9 ms。② 快速自旋回波(FSE)序列 T_2 WI,TR 4800 ms,TE 96 ms。③ 梯度回波序列(GRE) T_2^* WI,TR 800 ms,TE 26 ms。分别测量感兴趣区信号强度(SI),信号强度改变以下列公式计算 $\Delta SI = [(SI_{\text{标}} - SI_{\text{未标}}) / SI_{\text{未标}}] \times 100\%$ (ΔSI 为信号变化率, $SI_{\text{标}}$ 为标记细胞信号强度, $SI_{\text{未标}}$ 为未标记细胞信号强度)。图像由 2 名独立的 MR 专业技术人员进行分析判断。

1.8 细胞移植

结扎前降支建立猪急性心肌梗死模型($n = 1$, 图 1) 2 周后开胸直视下经心外膜向左室梗死交界区(梗死区呈紫黑色)和正常心肌内缓慢注射 1×10^6 细胞,每点 150 μ l,共 4 点。其中 2 点为磁标记细胞,2 点为未标记细胞。轻压注射点片刻关胸。移植后 1 周进行体部相控阵线圈心电图门控下 GRE 序



MI 为心室梗死区,呈紫黑色;N 正常心肌,呈红色;两者之间为交界区。箭头所指为前降支结扎点

图 1 猪急性心肌梗死手术模型

列 T_2^* WI MR 成像,矩阵 256×125 ,层厚 4 mm,TR 122 ms,TE 12.1 ms。显像后处死动物,低信号区心肌组织普鲁士蓝染色。

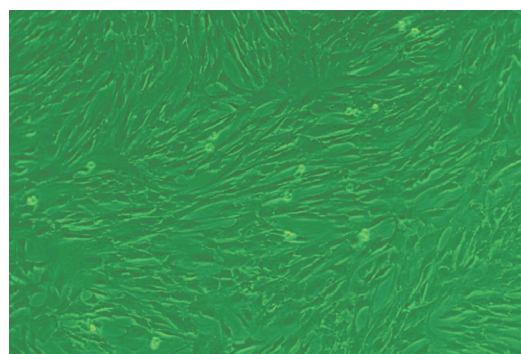
1.9 统计学分析

所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较应用 SPSS 11.5 软件 ANOVA 方差分析 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义

2 结果

2.1 体外细胞培养及标记结果

骨髓液接种 24 h 即有少量细胞贴壁生长,呈卵圆形或细小梭形,72 h 后贴壁细胞伸展,7 d 后出现较大的克隆,为形态均一的梭形细胞,大约经 10 ~ 14 d 达 80% ~ 90% 融合。传代细胞生长旺盛时呈漩涡样,平均每 3 ~ 5 d 左右即可传代。取第 3 代细胞作铁标记(图 2)。



DMEM 培养液传代培养第三代的 MSC 形态:细胞大多呈长梭形或成纤维细胞样,排列成线状或稻穗样条索状分布

图 2 光镜下 MSC 形态

2.2 标记后细胞内铁离子的衰减

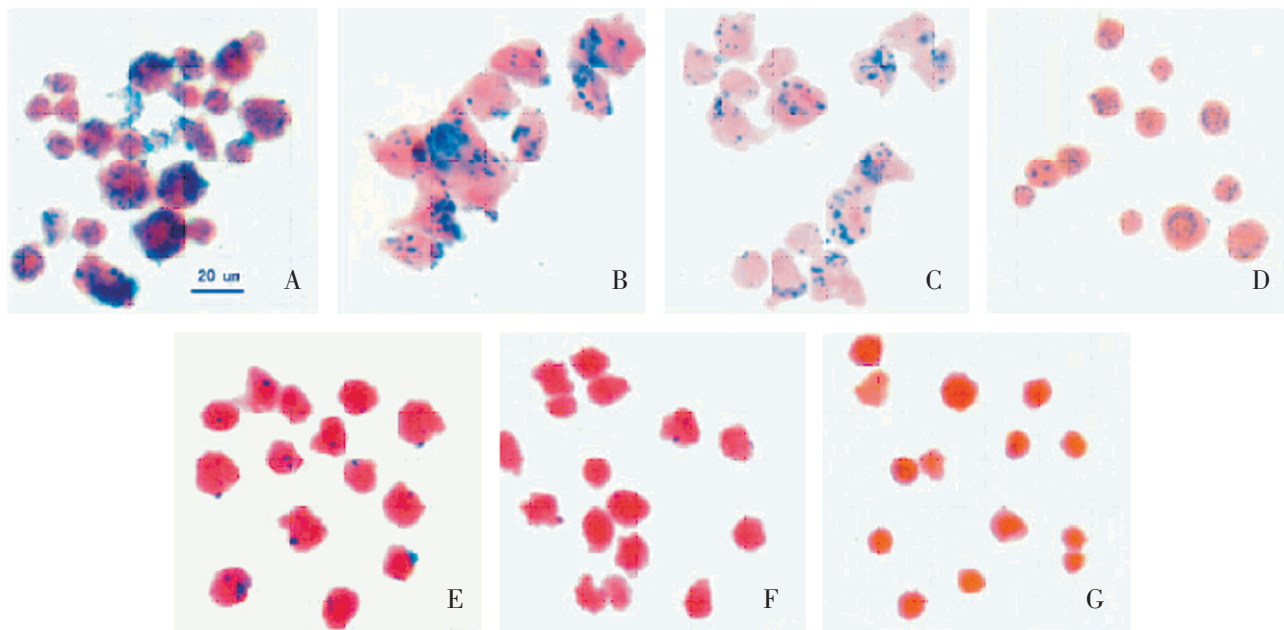
如图 3~4 所示,SHU555A-PLL 标记的 MSC 经普鲁士蓝染色后在光镜下观察,细胞内可见大量蓝色颗粒,标记率为 100%,细胞内铁离子含量平均为 $(13.13 \pm 2.30) \mu\text{g}/\text{细胞}$ 。随细胞的分裂增殖,细胞内蓝染颗粒逐渐减少,铁离子含量逐渐减少,到 16 d 时细胞内残存少许铁颗粒,铁离子含量下降到 $(0.68 \pm 0.20) \mu\text{g}/\text{细胞}$,20 d 时 $(0.28 \pm 0.07) \mu\text{g}/\text{细胞}$,接近标记细胞水平 $(0.21 \pm 0.06 \mu\text{g}/\text{细胞})$, P 均 > 0.05 。而未标记的细胞胞质内未见着色颗粒。

2.3 标记对细胞生长活力的影响

各时间点磁标记细胞的锥虫蓝拒染率在 91% ~ 94% 之间,与相应的未标记细胞无统计学差异($P > 0.05$)(图 5)。

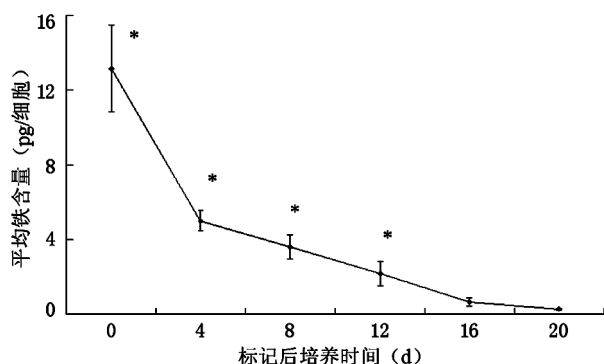
2.4 标记细胞体外 MR 成像

2.4.1 不同数量磁标记 MSC 3 种序列成像所显示



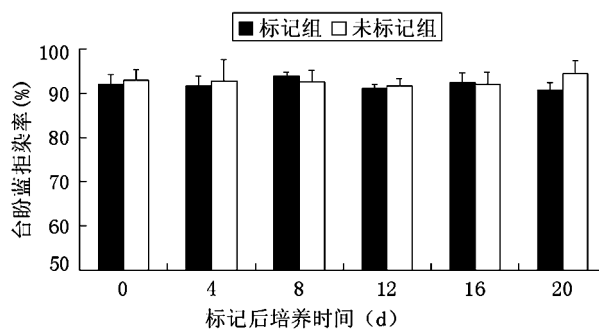
A SHU555A-PLL 标记 24 h 后的 MSC 经普鲁士蓝染色后在光镜下观察,细胞内可见大量着色(蓝色)颗粒,标记率为 100%。B~F 分别为标记后继续培养 4、8、12、16 和 20 d 的细胞,随细胞的分裂增殖,细胞内蓝染颗粒逐渐减少,到 20 d 时只有少量细胞内可见少许铁颗粒。G:为未标记细胞,胞质内未见普鲁士蓝着色颗粒。

图 3 磁标记细胞的铁染色颗粒衰减



随着标记后继续培养时间的进展,细胞内铁离子含量逐渐下降,第 16 和 20 d 时,细胞内平均铁含量和未标记细胞差异无统计学意义;与未标记细胞的平均细胞铁含量比较 * $P < 0.01$

图 4 磁标记细胞的铁浓度衰减



标记后不同时间点磁标记细胞的锥虫蓝拒染率与未标记细胞间差异无统计学意义(P 均 > 0.05)

图 5 磁标记细胞的锥虫蓝拒染率

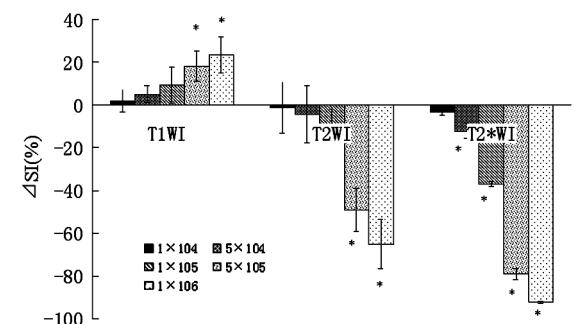
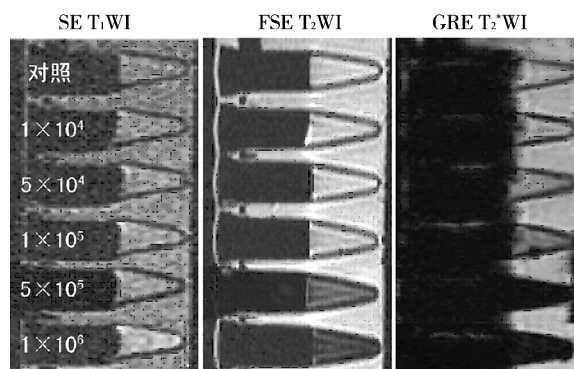
的信号改变见图 6。相比 T_2WI 和 T_1WI , GRE T_2^*WI 信号改变最为明显,成像细胞数量越多,信号改变越明显。同时 T_2^*WI 的磁敏感效应也使相应图像放大失真,气体交界区大量伪像出现。

2.4.2 信号强度改变率(ΔSI)的量化分析也证实图像直观判断。3 个序列中, T_2^*WI 的信号强度改变率最大, T_2WI 次之, T_1WI 最小。如 5×10^4 磁标细胞信号在 T_1WI 和 T_2WI 的 ΔSI 分别为 (5.04 ± 4.11) 和 (-4.43 ± 13.40) , 与未标记比较均未见明显改变,但 T_2^*WI 已有明显下降 ($\Delta SI = 12.18 \pm 3.51$, $P < 0.05$), 说明 T_2^*WI 检测顺磁信号的灵敏度高。另外, ΔSI 随着细胞数量的增加而增大,两者呈正相关。

2.4.3 MSC 磁标记后变化 在培养不同时间,均采用 1×10^6 个细胞进行 MR 成像,发现随着体外培养时间延长, T_2^*WI 磁标低信号逐渐消失。进一步量化分析显示(图 7), 3 种序列 MR 信号强度改变率均演变趋向为 0。3 种序列中以 T_2^*WI 信号改变幅度最为明显, 12 d 以后信号强度和未标记细胞对照组接近,这与前述的细胞内铁离子浓度的下降演变相一致。

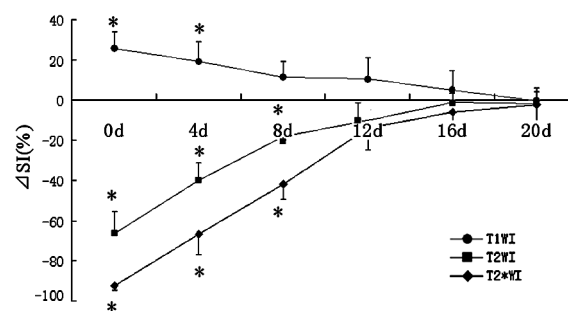
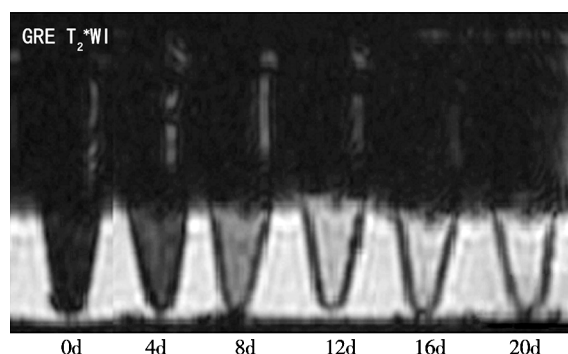
2.4.4 常规使用的 1.5 T MR 成像仪的灵敏度 此仪器最少能检测到 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个 SHU555A-PLL 标记的 MSC(图 8)。

2.5 标记细胞心肌内移植后的 MR 成像



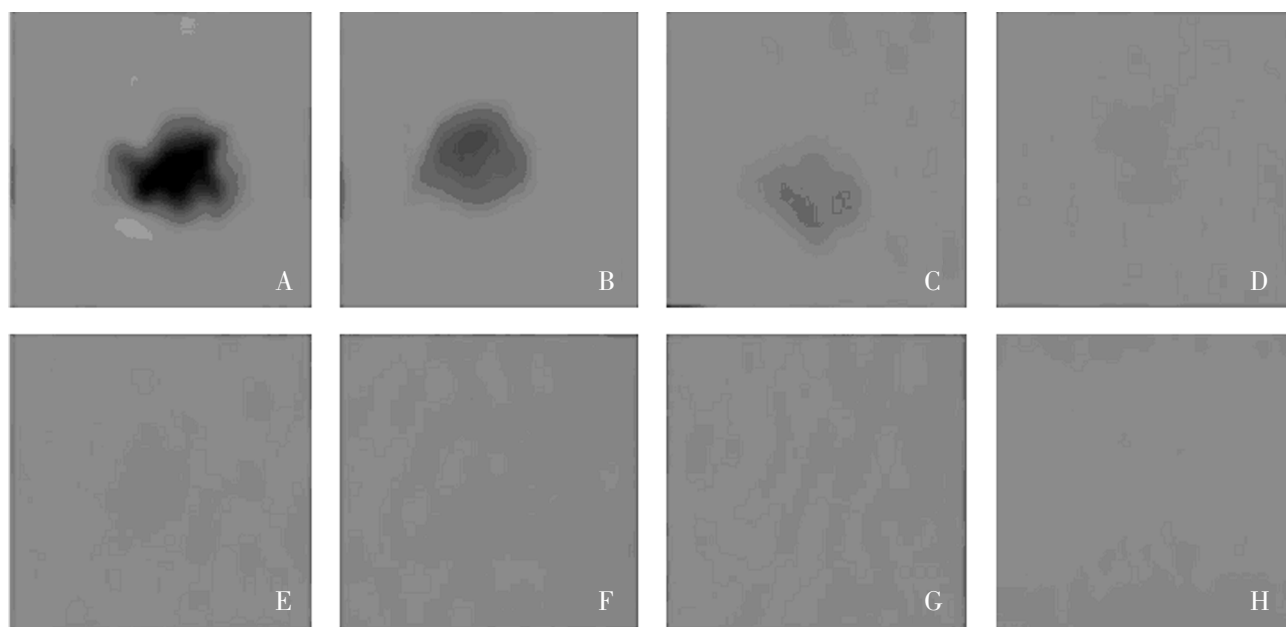
上帧显示标记细胞的 SE T_1 WI 信号轻度升高, 但变化不明显; FSE T_2 WI 和 GRE T_2^* WI 信号降低, T_2^* WI 最为明显; 细胞数量越多, 信号改变越明显; 同时 T_2^* WI 的磁敏感效应也使相应图像放大失真, 气体交界区大量伪像出现。下帧为信号强度改变值 (ΔSI) 的量化分析; 与无标记对照组的 SI 比较 $^*P < 0.05$

图 6 不同数量磁标记 MSCs 的 MR 不同序列成像



上帧显示随着标记后体外培养时间的延长, T_2^* WI 磁标低信号逐渐消失; 下帧为不同序列 MR 信号强度改变值 (ΔSI) 的演变, T_2^* WI ΔSI 的变化幅度比 T_1 WI、 T_2 WI 明显, 12 d 以后信号强度和未标记细胞无统计学意义差异; 与 1×10^6 未标记细胞的 SI 比较 $^*P < 0.05$

图 7 1×10^6 磁标记 MSCs 体外培养时间和 MRI 信号的关系

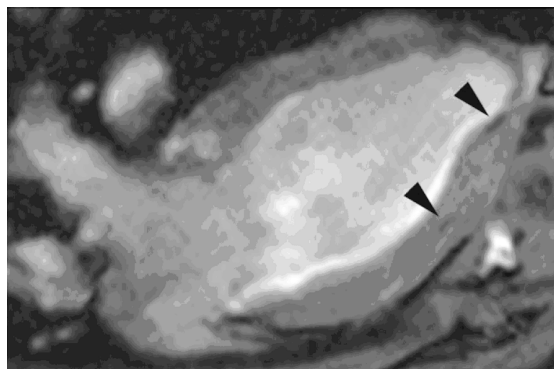


A: 1×10^6 ; B: 5×10^5 ; C: 1×10^5 ; D: 5×10^4 ; E: 1×10^4 ; F: 5×10^3 ; G: 1×10^6 未标记细胞; H: 琼脂糖凝胶, 此标记方案的显像阈值为 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$

图 8 SHU555A-MSCs 的体外琼脂内检测阈值

心肌梗死猪细胞移植后 1 周行 T_2^* WI 成像, 左室壁注射磁标 MSC 的 2 个部位均呈明显的低信号区, 与周围心肌构成明显对比 (图 9), 而非标记细胞的 2

个注射点均未显示低信号。动物处死后低信号区病理切片见普鲁士蓝染色阳性细胞。



1 × 10⁶ 个 SHU555A 标记 MSCs 植入猪心肌梗死模型的梗死交界区和正常区, T₂*WI 见移植部位明显低信号区

图 9 磁标记 MSC 的心肌内活体显像

3 讨论

3.1 SHU555A 的标记效率与 MR 检测阈值

干细胞移植后无创性活体示踪能有效地解决目前干细胞治疗中许多困惑和争议,已成为目前研究的热点。其中,MR 对比剂标记后 MR 成像受到了国内外相关学科的重视。应用最为普遍的磁标记方案是菲立磁(Ferumoxides,商品名 Feridex,直径为 50 nm)和高分子量 PLL 组合。PLL 作为一种非特异性转染剂,包裹 SPIO 后通过静电作用能有效介导氧化铁微粒进入细胞,能使细胞对铁的摄取增加 2.6 倍^[3]。本课题使用的 SHU555A 颗粒直径 62 nm,大于菲立磁,更有利于细胞摄取。我们对标记细胞内铁离子进行定量,发现以 25 : 0.75 μg/ml SHU 555A-PLL 24 h 方案标记猪 MSC,能使细胞内平均铁离子浓度达到(13.13 ± 2.30) μg/细胞,与 25 : 3 μg/m 菲立磁-硫酸鱼精蛋白 24 h 标记方案^[4]、25 : 0.75 μg/m 菲立磁-PLL 24 h 标记方案^[5]的标记效率相接近。证明 SHU555A-PLL 同样能高效标记 MSCs。

为观察细胞迁移的具体情况,或观察经血管注射的细胞分布,探测极少量的细胞显得尤为重要。细胞标记效率的高低直接决定 MR 能检测的最少细胞量,标记效率的不同导致相同磁场强度下细胞探测阈值的不同。Daldrup-Link 等^[6]用 AMI-227 (Ferumoxtran) 菲立磁、P7228 脂质体转铁蛋白-磁性多醣纳米颗粒标记造血前体细胞,细胞内含铁量分别为(0.11 ± 0.04) (0.24 ± 0.07) (0.18 ± 0.05) (0.98 ± 0.24) μg / 10⁵ 细胞,较低铁标记效率导致 1.5 T MR 仪探测阈值偏低,分别为 5 × 10⁵、2.5 × 10⁵、2.5 × 10⁵ 和 1 × 10⁵ 个细胞。而 Matuszewski 等^[5]报道 1.0 mg/ml SHU555A-脂质体 24 h 标记方案标记人肺癌肿瘤细胞(CLL-185),细胞内铁高达(4.37 ± 0.08) μg/10⁵ 细胞,1.5 T MR 仪能检测到 1 × 10⁴

细胞;本研究采用 25 : 0.75 μg/ml SHU555A-PLL 24 h 标记方案,细胞内铁(1.31 ± 0.23) μg / 10⁵ 细胞,1.5 T MR 检测到 5 × 10⁴ ~ 1 × 10⁵ 个猪 MSC。上述 3 组研究标记效率、MR 细胞阈值的差异,一方面源于铁剂种类大小和包被、标记时间和转染剂使用的不同,除此之外,可能与细胞种类和吞噬活力不同也密切相关。

影响 MR 检测阈值的另一决定性因素是 MR 仪磁场强度和空间分辨率。最近已有体外 MR 单细胞成像的报道,如 Stroh 等^[7]用 17.6 T MR 仪检测 SPIO 纳米颗粒标记大鼠胚胎干细胞[细胞内铁为(7.1 ± 0.4) μg / 10⁵ 细胞],体外凝胶成像探测阈值为 10 个细胞,定向注射到大鼠纹状体的探测极限为 10 ~ 100 个标记细胞,显示了超强磁场强度 MR 仪示踪干细胞的巨大价值。但现有 MR 成像仪磁场强度和成像条件下,增加干细胞铁标记效率是提高检测灵敏度的有效途径,而本研究采用的 SHU555 A-PLL 方案值得推荐采用。

3.2 细胞数量与 MR 信号强度

对于氧化铁纳米颗粒来说, R₂* 效应比 R₂ 效应强得多,而且磁敏感效应使信号改变的体积大大超过细胞本身所占据的实际大小,这就增加了标记细胞在 MR 上的发现率。我们以 3 种序列行标记干细胞 MR 成像,证实 GRE T₂*WI 序列对磁标记干细胞的显示最为敏感,5 × 10⁴ 个细胞即可引起明显的信号改变。并且随着细胞数目的增加,3 种序列的信号改变均呈剂量依赖型增加,尤其是 T₂*WI 信号改变幅度最大,与国内外有关研究一致^[6],说明 MR 信号改变与铁含量、细胞数目之间存在一定关系。但由于 T₂*WI 磁敏感效应也使相应图像放大失真,气体组织交界面磁敏感伪影很大,在一定程度上干扰了信号噪声比(SNR)和信号强度的测量,所以是否可根据 MR 信号强度的改变来推测铁含量乃至细胞数目,尚需进一步探讨。国内外也有学者试图通过测量 R₂* 值、低信号区直径或容积估计细胞内铁浓度和细胞数量:发现 R₂* 值和细胞内铁浓度存在线性相关^[8];信号缺失直径明显受到回波时间和空间分辨率的影响,信号缺失直径是局部铁离子浓度的对数函数^[9];低信号区面积和注射的细胞量呈线性相关^[10]。但该领域研究尚处于初级阶段,上述参数的测量评定会受仪器磁场强度和分辨率、气体交界面以及体内呼吸运动、肠蠕动等诸多因素的影响,加上体外干细胞如 MSC 摄取氧化铁颗粒不均一性、SPIO 标记后细胞内铁会随着细胞的分裂、死亡而变

化, 所以体内外移植细胞的定量仍然存在很多问题。

3.3 信号衰减与示踪

Arbab 等^[5]报道分裂型 Hela 细胞菲立磁标记后经 2 ~ 3 周细胞内普鲁士蓝染颗粒消失, 而非分裂型(长满后接触抑制)人 MSCs 细胞铁颗粒存留时间长达 43 d 以上。本研究发现, 随着 MSCs 的不断分裂增殖和细胞内铁逐渐减少, MR 信号降低的幅度也相应减少, 第 16 ~ 20 d 已基本达到未标记细胞水平。所以不难推论, 细胞内铁的衰减速度与细胞的不同分裂增殖状态之间存在相当关系, MR 信号强度随时间的下降主要原因是细胞分裂稀释。但能否根据植入体内细胞的信号衰减情况来评价标记细胞增殖分裂速度, 尚不得而知, 因为难以排除代谢清除和细胞死亡的干扰。如有可能利用 MR 信号强度和范围的改变间接判断移植干细胞在体内的分布密度及增殖状态, 将对理解干细胞的命运和作用机制产生深远影响。

令人费解的是, 体外细胞实验中 MSC 内铁随着分裂增殖和换液短期内即消失殆尽, 但大量文献报道, 注入活体动物梗死心肌的含铁颗粒 MSCs 却能长期示踪数月之久^[11]。这种体外短期衰减和体内长期示踪的矛盾现象的原因尚难解释, 是否提示体内移植细胞增殖分裂速度较慢, 抑或增殖时胞质内铁丢失较少而大部分分配到子代细胞, 抑或植入后干细胞分化为非分裂型的心肌细胞, 抑或梗死心肌清除死亡移植细胞或细胞外铁障碍等问题尚需体内实验进一步探讨。

3.4 SHU555A 标记的安全性

本试验所采用的标记物 SHU555A 作为一种网状内皮系统靶向对比剂, 其安全性已被证实, 进入体内能具有生物可降解性, 能被细胞代谢后进入正常血浆铁池代谢过程, 已完成 III 期临床试验, 在部分欧洲国家已被批准使用。在本试验应用 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度进行干细胞标记, 铁的总用量远低于临床用量。不少研究表明菲立磁加上转染剂对干细胞存活、增殖和分化无短期或长期毒性作用^[12], 本研究锥虫蓝排除试验显示 20 d 内干细胞的活力无明显改变, 初步说明 SHU555A 标记对干细胞本身并无明显不良影响。

综上所述, 用 SHU555A-PLL 聚合物标记 MSCs 简单、高效、安全, 体外 MR 信号强度能一定程度上反映细胞数量及细胞增殖情况。另外, 本研究在国内首先对植入心脏的磁标细胞进行活体 MR 显像

示踪, 本课题组将对不同临床状况下干细胞心脏移植的示踪影像差别、体内移植细胞的定量等方面进行继续深入研究。

[参考文献]

- [1] Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders[J] Nature, 2006, 441: 1094 - 1096.
- [2] Bengel FM, Schachinger V, Dimmeler S. Cell-based therapies and imaging in cardiology[J] Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005, Suppl 2: S404 - S416.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, et al. Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents[J] Radiology, 2003, 228: 760 - 767.
- [7] Stroh A, Faber C, Neuberger T, et al. In vivo detection limits of magnetically labeled embryonic stem cells in the rat brain using high-field (17.6 T) magnetic resonance imaging[J] Neuroimage, 2005, 24: 635 - 645.
- [8] Bowen CV, Zhang X, Saab G, et al. Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells[J] Magn Reson Med, 2002, 48: 52 - 61.
- [9] Pintaske J, Helms G, Bantleon R, et al. A preparation technique for quantitative investigation of SPIO-containing solutions and SPIO-labelled cells by MRI[J] Biomed Tech (Berl), 2005, 50: 174 - 180.
- [10] Weber A, Pedrosa I, Kawamoto A, et al. Magnetic resonance mapping of transplanted endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization in ischemic heart disease[J] Eur J Cardiothorac Surg, 2004, 26: 137 - 143.
- [11] Stuckey DJ, Carr CA, Martin-Rendon E, et al. Iron particles for non-invasive monitoring of bone marrow stromal cell engraftment into, and isolation of viable engrafted donor cells from, the heart[J] Stem Cells, 2006, 24: 1968 - 1975.
- [12] Arbab AS, Yocum GT, Rad AM, et al. Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells[J] NMR Biomed, 2005, 18: 553 - 559.

(收稿日期 2006-10-09)