

• 论著 •

超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞移植 治疗兔脊髓损伤的磁共振活体示踪

张瑞平 李健丁 刘强 双卫兵 谢军

【摘要】 目的 通过蛛网膜下腔置管,将超顺磁性氧化铁(SPIO)标记后的骨髓间充质干细胞(MSCs)移植入兔脊髓损伤模型,观察脊髓损伤 MR 活体示踪移植细胞的可行性。方法 制作兔 SCI 模型,并在蛛网膜下腔置管以备移植。将实验用大白兔随机分为三组:A 组为移植 SPIO 标记细胞;B 组为移植未标记细胞;C 组不移植细胞只注射 PBS 液做对照组。在细胞移植后 3 d、7 d、14 d、21 d,进行 MR 活体示踪,并做病理学检测进行对照。结果 SPIO 标记的 MSCs 移植入脊髓损伤模型后 7 d,MR 扫描的 T2WI 上脊髓损伤区域出现点状低信号影;14 d 后 T2WI 上脊髓损伤区域的点状低信号影增多,21 d 后 T2WI 上脊髓损伤区域的点状低信号影减少。脊髓损伤区域组织切片行普鲁士蓝染色,发现局部组织上出现大量含蓝色铁颗粒的细胞,其细胞变化规律与 MR 示踪结果一致。结论 蛛网膜下腔移植的 SPIO 标记 MSCs 可定向迁移到脊髓损伤区域,利用 MR 可对移植细胞进行活体示踪。

【关键词】 间质干细胞; 脊髓损伤; 磁共振成像; 超顺磁性氧化铁

In vivo tracking of bone marrow mesenchymal stem cells labeled with superparamagnetic iron oxide after spinal cord injury in rabbits by magnetic resonance imaging ZHANG Rui-ping, LI Jian-ding, LIU Qiang, SHUANG Wei-bing, XIE Jun. Department of Radiology, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: ZHANG Rui-ping, Email: zrp_7142@163.com

【Abstract】 Objective Graft bone marrow mesenchymal stem cells labeled superparamagnetic iron oxide (SPIO) into the spinal cord injury models via subarachnoid space, to observe the feasibility of MRI tracking of grafted cells. **Methods** BMSCs were labeled with SPIO. Rabbit spinal cord injury models were made and the micro tubes were inserted into subarachnoid space. Rabbits were randomly divided into 3 group. Group A received SPIO labeled cells via subarachnoid spaces; Group B received unlabeled cells; Group C was injected by PBS liquid as the control group. Grafted BMSCs were tracked by Serial 1.5T MRI in 3, 7, 14 and 21 days after transplantation and compared with tissue slices of injured spinal cord. **Results** After BMSCs labeled with SPIO were grafted into the spinal cord injury, MRI test was performed at 7, 14, 21 days respectively. At 7 days, there appeared point-like low signal shadow in the injured spinal cord segment in T2WI; At 14 days, this low signal shadow increased; At 21 days, this shadow decreased. Cells containing blue iron particles in the area of spinal cord injury could be seen in tissue sections with Prussian blue staining. **Conclusions** Labeled BMSCs could migrate to the injured spinal cord segment after grafting via subarachnoid space, which could be tracked with MRI *in vivo*.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Spinal cord injuries; Magnetic resonance imaging; Superparamagnetic iron oxide

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种致残率非常高的疾病,目前对 SCI 的治疗仍缺乏有效手段。近年来,有骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,

MSCs)移植治疗脊髓损伤的实验研究,认为 MSCs 可以在宿主脊髓中存活、生长、分化,靶向迁徙于 SCI 区,并能促进神经功能恢复,为治疗 SCI 提供了一种新的思路 and 手段^[1-3]。而细胞移植后在活体内示踪成为随之而来的研究难点,近年来,随着超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)纳米颗粒标记细胞技术的成熟,磁共振(magnetic resonance, MR)活体示踪 SPIO 细胞成为新的研究热点^[4-6]。本实验拟采用 SPIO 纳米颗粒标记兔 MSCs,并移植入 SCI 兔模型行 MRI 扫描,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.13.044

基金项目:山西省青年科技研究基金(2010021038-2);山西省卫生厅科技攻关项目(2011017)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第一医院放射科(张瑞平、李健丁),骨科(刘强、双卫兵);山西医科大学分子生物教研室(谢军)

通讯作者:张瑞平,Email:zrp_7142@163.com

探讨干细胞移植治疗 SCI 过程中, MR 活体示踪干细胞靶向迁移的可行性。

材料与方 法

一、材料

1. 实验动物: 体重 600 ~ 700 g 的健康新西兰大白兔, 雌雄不拘。由山西医科大学实验动物中心提供。

2. 主要试剂和设备: DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司), 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司), 台盼蓝(美国 Sigma 公司), 多聚左旋赖氨酸(poly-L-lysine, PLL; 美国 Sigma 公司), 普鲁士蓝(天津化学试剂三厂), 吡啶橙生理染液(北京朝阳区旭东化工厂)。SPIO 纳米颗粒(德国 Schering 公司): 1.4 ml/支, 含铁浓度 0.5 mmol/ml, 铁颗粒直径(50 ± 5) nm。CO₂ 培养箱(SIM, 西盟国际), 超静工作台(常州华普达教学仪器有限公司), 倒置相差显微镜(Olympus-IX70, 日本), 激光共聚焦扫描显微镜系统(Olympus-FV1000, 日本), 1.5 T 磁共振成像系统(Sonata 机型, 德国 Siemens 公司)。

二、方法

1. MSCs 的培养、传代、标记: 按前期研究实验方法^[7-8]培养骨髓 MSCs, 用 SPIO 标记第三代骨髓 MSCs, 标记后骨髓 MSCs 行普鲁士蓝染色, 倒置相差显微镜下观察。

2. 激光共聚焦显微镜观察 MSCs 形态: 在接种有第 3 代培养骨髓 MSCs 的 12 孔板中加入 0.01% 的 AO 生理染液 2 ml, 染色约 5 min, 然后在激光共聚焦显微镜下观察骨髓 MSCs 的形态学特征。

3. 建立 SCI 模型和蛛网膜下腔置管: 3% 戊巴比妥钠对健康新西兰大白兔以 30 mg/kg 静脉注射麻醉, 取俯卧位固定于实验台上, 以第 12 胸肋关节作为定位标志, 显露 L1 ~ 3 棘突和椎板, 咬除 L2 棘突和椎板, 将骨窗修剪成圆形, 显露脊髓硬膜, 在硬膜表面垫与硬膜囊直径一致的塑料片, 应用自行研制的 SCI 模型实验台装置^[9], 致伤能量为 60 g/cm, 制作 SCI 模型。制作 SCI 模型同时, 行 L4 ~ 5 节段椎板切除术, 暴露硬脊膜, 注射器针头轻轻挑开, 插入 PE 微管, 看到脑脊液流出视为置管成功, 将微管头端用手术缝线固定在脊柱上, 尾端露出体外, 并灼烧封闭。

4. SCI 模型移植细胞和活体 MRI: 选健康新西兰大白兔 30 只, 造 SCI 模型后随机分为三组, 每组 10 只。分别在 SCI 造模后第 7 天, 剪开 PE 微管体外末端部分, 各组分别注射入不同的细胞悬液或 PBS 液。A 组: 用微量注射器将含有 1×10^6 个 SPIO 标记的 MSCs 的细胞悬液 50 μ l 缓慢注入 SCI 模型内蛛网膜腔; B 组:

向蛛网膜腔缓慢注入含有 1×10^6 个的 MSCs 的细胞悬液 50 μ l; C 组: 注射入 50 μ l PBS 液作为对照组, 注入后分别再灼烧 PE 微管将其封闭。随机抽取各组 SCI 模型大白兔, 在细胞移植后 3 d、7 d、14 d、21 d 分别进行 MRI 扫描。

5. 损伤组织普鲁士蓝染色: 随机抽取各组 SCI 模型大白兔, 于细胞移植后 1 d、7 d、14 d、21 d 处死, 取 SCI 部位组织。将脊髓组织块置入 4% 多聚甲醛溶液中浸泡、固定, 共 12 ~ 24 h。然后脊髓组织经冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片, 行普鲁士蓝染色。

6. 行为学评价(BBB 分级法): 对各组 SCI 模型进行神经功能恢复的评价。在不同时间点(损伤 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d), 由两名熟悉 BBB(the Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale) 评分标准的非实验人员独立观察记录, 最后取平均值。

三、统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行处理所有数据, 统计方法选用两因素析因设计方差分析, 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

结 果

1. 骨髓 MSCs 的形态学: 细胞接种 24 h 后开始有贴壁生长, 镜下可见稀疏的单个细胞贴壁生长; 48 h 后可见贴壁的细胞开始分裂增生; 3 ~ 4 d 后可见贴壁细胞数目明显增加, 呈集落样增殖, 7 ~ 8 d 细胞达 90% ~ 95% 融合; 每周传代 1 次, 传至 3 代时, 细胞呈分布均匀的纺锤形(图 1)。MSCs 用吡啶橙染色激光共聚焦显微镜观察, 细胞大多呈现梭形外观, 胞核染色明显, 呈绿色卵圆形(图 2)。SPIO 标记后 MSCs 经普鲁士蓝染色, 镜下见细胞标记率接近 100%, 细胞的胞质内大量蓝染的铁颗粒(图 3), 说明细胞标记成功。

2. SCI 模型的 MRI: 三组于移植后 3 d 行 MRI 扫描, 各组 T1WI 和 T2WI 上均可见到在损伤区有明显的高信号影, 提示水肿。于移植后 7 d 行 MRI 扫描, T2WI 上 A 组在 SCI 区的高信号影周边出现小点状低信号影(图 4), 而 B、C 组在 SCI 区仍然见高信号影, 未见点状低信号影。于移植 14 d 后 MRI 扫描, A 组 SCI 节段可以看到点状的 T2 低信号影明显增多(图 5)。于移植 21 d 后 MRI 扫描, A 组 SCI 点状的 T2WI 上点状的低信号影减少。

3. SCI 模型兔 SCI 区组织普鲁士蓝染色: A 组在细胞移植后 1 d, SCI 区未见蓝染铁颗粒的细胞(SPIO 标记的 MSCs); A 组在细胞移植后 7 d, SCI 区出现了少量的胞质内含蓝染铁颗粒的细胞; A 组在细胞移植后 14 d, SCI 区可见胞质内含蓝染铁颗粒的细胞明显增多, 且

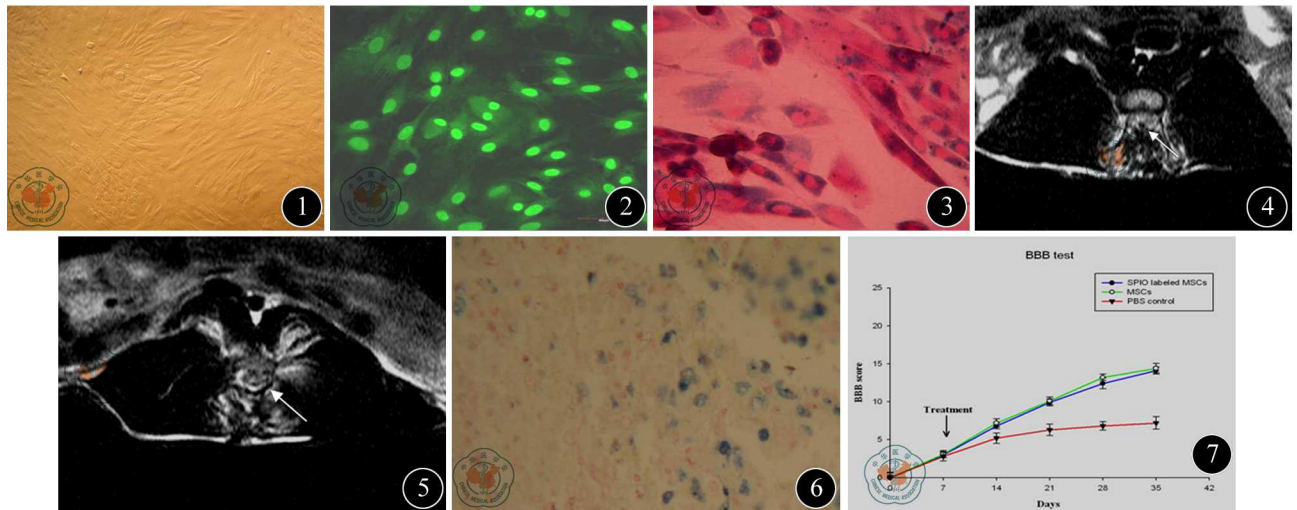


图1 显微镜下:第3代MSCs,细胞呈分布均匀的纺锤形($\times 100$) 图2 吡啶橙染色,激光共聚焦显微镜下:MSCs梭形外观($\times 100$) 图3 SPIO标记MSCs行普鲁士染色见细胞内含蓝染铁颗粒($\times 100$) 图4 SPIO标记MSCs移植组7 d后MRI见SCI区出现点状低信号影(箭头所示) 图5 SPIO标记MSCs移植组14 d后MRI见SCI区点状低信号影明显增多(箭头所示) 图6 SPIO标记MSCs移植组14 d后普鲁士蓝染色SCI区见含铁颗粒的MSCs($\times 100$) 图7 脊髓损伤后不同时间点各组BBB评分曲线

细胞主要集中在损伤较严重区(图6);细胞移植后21 d,SCI区含蓝染铁颗粒的细胞较移植14 d的数量略多,但部分细胞内蓝染程度略有下降,考虑是细胞分裂、增殖而引起细胞内铁颗粒的下降所致。其移植细胞的变化规律与MRI图像信号的改变特点一致,从而验证了MSCs经蛛网膜腔移植后,定向迁徙到SCI组织的过程。

4. MSCs促进SCI兔的功能恢复:从细胞移植SCI模型后14 d开始,MSCs移植组SCI功能有所改善,MSCs的标记与未标记对功能的恢复无影响,A、B两组都与C组的BBB评分差异有统计学意义($P < 0.05$),A、B两组间的BBB评分差异无统计学意义($P > 0.05$),见图7。

讨 论

SPIO为一种纳米级铁颗粒,能在很低的浓度下引起MR信号改变,SPIO活体内成像的方法多为将SPIO标记靶细胞,再将一定量的标记细胞注入活体,经MR扫描获得信号对比来显像^[8],近年来,此方法已经引起人们越来越广泛的兴趣^[10-12]。MSCs可在特定条件下分化为多种组织谱系的细胞,是良好的组织工程的载体细胞,用于组织损伤的修复与重建,具有广阔的临床应用前景^[13-14]。根据我们前期实验,利用多聚赖氨酸(PLL)介导的转染技术,用SPIO有效地标记了MSC,并且在该方法安全、有效,对细胞活性无影响,并可进行活体外的MRI研究^[7-8],为本研究MR活体内示踪移植干细胞分布、迁移奠定了重要的实验基础。

MR分子成像具有较高的分辨率,能够分辨近似于细胞大小的组织。Heyn等^[15]运用1.5 T常规MR设备在鼠脑内检测出单个SPIO标记细胞,使常规MR示踪活体内的单个细胞成为了可能。Peldschus等^[16]利用3 T的MR设备检测出单个SPIO标记的间充质干细胞,提出利用MR对标记干细胞的定量分析是可行的方法。高分辨MRI是干细胞检测和示踪的较理想的手段,具有良好的应用前景^[17-18]。

本实验通过蛛网膜腔移植SPIO标记MSCs进行MRI扫描:移植后7 d行MR扫描,T2WI发现了SPIO标记的MSCs向损伤区迁移的点状低信号改变;移植14 d行MR扫描,SCI节段可以看到点状的T2低信号影明显增多;于移植21 d行MRI扫描,SCI点状的T2低信号影减少。以上T2信号的变化提示:在标记细胞移植后7 d,经蛛网膜腔移植的SPIO标记MSCs向SCI区域聚集到一定程度,可被MR活体示踪到;标记细胞移植后14 d,由于SPIO标记MSCs向损伤组织区定向迁徙的细胞数量增多,引起的MR信号改变也增强;但随着时间继续的延长,细胞的信号开始下降,考虑是由于细胞增殖、分裂,引起细胞内铁含量降低而导致信号的减弱。该结果说明:SPIO标记MSCs经蛛网膜腔移植SCI模型后,细胞会向SCI区域迁移,随着时间的推移,定向迁徙的细胞数量会逐渐增加,达到一定程度时既可被MR活体示踪到,SCI的功能也有所改善;并随着细胞数量的增多,T2WI的点状低信号会增加,SCI的功能恢复也较明显;但标记细胞在体内时间过长,由于细胞的分裂、增殖,细胞内的铁含量会因此而下降,低

信号改变会逐渐下降,最终将无法示踪到细胞,这可能是MR活体示踪的缺陷之一。另外,我们通过对SCI组织切片行普鲁士蓝染色和功能恢复评分,验证了上述MR信号变化的规律,提示MSCs向SCI区的迁移是定向的。通过蛛网膜下腔移植MSCs在受损脊髓中存活、聚集和定向迁移的机制尚不清楚,我们认为这可能是脊髓组织受到损伤后分泌的某种或某些趋化因子的吸引作用引起的。

本实验结果表明MRI可活体示踪SPIO标记的治疗性的移植细胞,这一技术将克服传统干细胞示踪方法只能在离体状态下分析的局限性,有助于实时、动态观察移植后干细胞在活体内的分布及存活状况,对于评估干细胞移植的效果以及优化干细胞移植的治疗方案有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Ban DX, Ning GZ, Feng SQ, et al. Combination of activated Schwann cells with bone mesenchymal stem cells; the best cell strategy for repair after spinal cord injury in rats. *Regen Med*, 2011, 6:707-720.
- [2] Shi CY, Ruan LQ, Feng YH, et al. Marrow mesenchymal stem cell transplantation with sodium alginate gel for repair of spinal cord injury in mice. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2011, 40:354-359.
- [3] Alexanian AR, Fehlings MG, Zhang Z, et al. Transplanted neurally modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote tissue protection and locomotor recovery in spinal cord injured rats. *Neurorehabil Neural Repair*, 2011, 25:873-880.
- [4] Willenbrock S, Knippenberg S, Meier M, et al. In vivo MRI of intraspinally injected SPIO-labelled human CD34⁺ cells in a transgenic mouse model of ALS. *In Vivo*, 2012, 26:31-38.
- [5] Ren Z, Wang J, Zou C, et al. Labeling of cynomolgus monkey bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell tracking by multimodality imaging. *Sci China Life Sci*, 2011, 54:981-987.
- [6] Chickera S, Willert C, Mallet C, et al. Cellular MRI as a suitable, sensitive non-invasive modality for correlating in vivo migratory efficiencies of different dendritic cell populations with subsequent immunological outcomes. *Int Immunol*, 2012, 24:29-41.
- [7] 张瑞平,刘强,李健丁,等.超顺磁性氧化铁标记BMSCs生物学特性及MRI成像研究. *中国修复重建外科杂志*, 2009, 23:851-855.
- [8] 张瑞平,刘强,李晶,等.超顺磁性氧化铁标记鼠骨髓间充质干细胞的体外MR成像研究. *中国医学影像学杂志*, 2009, 17:257-261.
- [9] 双卫兵,刘强.自制脊髓损伤动物模型实验台的结构与使用. *实用医技杂志*, 2010, 17:703-705.
- [10] Novotna B, Jendelova P, Kapcalova M, et al. Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles. *Toxicol Lett*, 2012, 210:53-63.
- [11] Tong L, Zhao M, Zhu S, et al. Synthesis and application of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in targeted therapy and imaging of cancer. *Front Med*, 2011, 5:379-387.
- [12] Hu J, Qian Y, Wang X, et al. Drug-Loaded and Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Surface-Embedded Amphiphilic Block Copolymer Micelles for Integrated Chemotherapeutic Drug Delivery and MR Imaging. *Langmuir*, 2012, 28:2073-2082.
- [13] 郭晓鹤,步星耀,姜金豆,等.自体骨髓干细胞动员联合辛伐他汀治疗脑出血的实验研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 12:7248-7255.
- [14] Chen J, Liu R, Yang Y, et al. The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons. *Neurosci Lett*, 2011, 505:171-175.
- [15] Heyn C, Ronald JA, Mackenzie LT, et al. In vivo magnetic resonance imaging of single cells in mouse brain with optical validation. *Magn Reson Med*, 2006, 55:23-29.
- [16] Peldschus K, Kaul M, Lange C, et al. Magnetic resonance imaging of single SPIO labeled mesenchymal stem cells at 3 Tesla. *Rofo*, 2007, 179:473-479.
- [17] Reddy AM, Kwak BK, Shim HJ, et al. In vivo tracking of mesenchymal stem cells labeled with a novel chitosan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles using 3.0T MRI. *J Korean Med Sci*, 2010, 25:211-219.
- [18] Hu SL, Lu PG, Zhang LJ, et al. In vivo magnetic resonance imaging tracking of SPIO-labeled human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 2012, 113:1005-1012.

(收稿日期:2012-02-13)

(本文编辑:吴莹)

张瑞平,李健丁,刘强,等.超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞移植治疗兔脊髓损伤的磁共振活体示踪[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(13):3607-3610.