

MRI monitoring the distribution of systematic engrafted marrow mesenchymal stem cells labeled with Feridex in the liver and spleen in vivo

DUAN Xiao-hui¹, SHEN Jun^{1*}, FU Yue¹, CHENG Li-na¹, ZHONG Xiao-mei¹, LIANG Bi-ling¹

(1. Department of Radiology, 2. Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective** To observe the distribution of the marrow mesenchymal stem cells (MSCs) labeled with Feridex in the liver and spleen after transplantation via common carotid artery with MR imaging. **Methods** MSCs of SD rats were labeled with Feridex using Protamine as transfection agent. The feasibility and safety of MSCs labeling were assessed. Thirty rats with global cerebral ischemia were randomly selected to be transplanted with 5×10^6 labeled MSCs (labeled group) or unlabeled MSCs (unlabeled group) via common carotid artery equally. After transplantation serial MR imaging of the liver and spleen were performed to measure signal intensity ratio of liver and spleen to muscle. The liver and spleen tissues were sampled for Prussian blue staining. **Results** The labeling efficiency of MSCs with Feridex was about 100%. There was no statistical difference of Trypan blue exclusion rate and the optical absorption value in the MTT proliferation test between labeled cells and unlabeled cells within 7 d ($F = 0.27 - 2.06$, $P > 0.05$; $F = 0.025 - 0.322$, $P > 0.05$). Signal intensity on FFE T1WI of the liver and spleen of labeled group decreased. No statistical difference of liver signal intensity ratio was found between the two groups at 3rd day ($F = 4.72$, $P > 0.05$), nor of spleen signal intensity ratio at 7th day ($F = 3.89$, $P > 0.05$). The liver and spleen of labeled group had numerous Prussian blue staining positive particles, but gradually decreased as time went by. **Conclusion** Labeling MSCs with Feridex and Protamine is efficient and safe. A large quantity of labeled MSCs distribute in the liver and spleen during transplantation via common carotid artery majority. [Key words] Mesenchymal stem cells; Magnetic resonance imaging; Carotid artery, common; Cell transplantation; Liver; Spleen

MRI 活体监测菲立磁标记大鼠骨髓间充质干细胞经动脉移植后的肝、脾分布

段小慧¹, 沈君^{1*}, 符岳², 成丽娜¹, 钟小梅¹, 梁碧玲¹

(1. 中山大学附属第二医院放射科, 2. 急诊科, 广东 广州 510120)

[摘要] **目的** 探讨菲立磁(Feridex)标记大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)经颈总动脉移植后 MRI 上肝、脾内的分布情况。**方法** 30 只全脑缺血损伤模型大鼠进入研究, 随机平均分为: 标记组及未标记组; 均经颈总动脉移植 MSCs。标记组 MSCs 以硫酸鱼精蛋白为载体进行 Feridex 标记, 标记后行可行性及安全性检测。移植后对两组进行 MR 检查, 测量肝、脾与肌肉的信号强度比, 并取病理标本行普鲁士蓝染色。**结果** MSCs 的 Feridex 标记率达 100%, 标记与未标记 MSCs 的台盼蓝拒染率、MTT 染色间差异无统计学意义 ($F = 0.27 \sim 2.06$, $P > 0.05$; $F = 0.025 \sim 0.322$, $P > 0.05$)。标记组 MSCs 大鼠 FFE T1WI 上肝脾信号减低, 移植后第 3 d, 标记与未标记组肝脏信号差异无统计学意义 ($F = 4.72$, $P > 0.05$)。移植后第 7 d 时, 标记与未标记组脾脏信号差异无统计学意义 ($F = 3.89$, $P > 0.05$)。普鲁士蓝染色示标记组肝、脾内可见较多蓝染铁颗粒, 随时间逐渐减少。**结论** 菲立磁标记大鼠 MSCs 安全有效, 经颈总动脉移植后标记 MSCs 较多分布于肝、脾内。

[关键词] 间充质干细胞; 磁共振成像; 颈总动脉; 细胞移植; 肝; 脾

[中图分类号] R445.2; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2009)05-0723-04

[基金项目] 国家自然科学基金(30400115, 30801081), 广东省自然科学基金(04300241)。

[作者简介] 段小慧(1982-), 男, 湖南郴州人, 在读硕士。研究方向: 分子影像学与骨骼肌肉系统。E-mail: duanxiaohui - 128@163.com

[通讯作者] 沈君, 中山大学附属第二医院放射科, 510120。E-mail: vencentjsj@tom.com

[收稿日期] 2008-11-09 [修回日期] 2009-01-07

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 移植治疗中枢神经系统缺血损伤已成为研究热点^[1-2], 移植途径主要有局灶移植及血管内移植两种, 前者适合于范围较局限的脑梗死, 后者较适用于损伤广泛的全脑缺血治疗^[2-3]。有关 MSCs 经血管移植后在脑外其他脏器的分布研究较少, 且多通过离体病理组织学进行研究^[2,4-5]。本研究在前期建立全脑缺血损伤大鼠模型的基础上, 以硫酸鱼精蛋白 (Protamine, Pro) 为载体, 用菲立磁 (Feridex) 标记大鼠 MSCs, 经颈总动脉移植后, 利用 MRI 活体观察 MSCs 在肝、脾脏内的分布及其随时间的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 SD 大鼠 40 只 (中山大学动物实验中心提供), 雌雄不限, 供取 MSCs 及细胞移植使用。主要试剂: 台盼蓝 (Sigma 公司), 四氮嘧啶蓝 (MTT, Fluka 公司), 二甲亚砜 (DMSO), Becton Dickinson AnnexinV-异硫氰酸荧光素 (FITC) 凋亡检测试剂盒, Feridex 及 Pro。主要设备: Herabus CO₂ 培养箱, Nikon 荧光倒置显微镜, BD 流式细胞仪, 日立 H-600 透射电镜电子显微镜, LabSystems Dragon Wellscan MK3 型自动分析酶标仪及自制心肺复苏装置。

1.2 实验方法

1.2.1 MSCs 磁性标记的可行性和安全性

(1) 可行性: MSCs 的分离、培养参见文献^[7]。PBS 液将 Pro 稀释成 1 mg/ml, 无血清 DMEM/F12 培养基稀释 Feridex (Fe 含量: 11.2 mg/ml) 成 Fe 100 μg/ml 悬液备用。将 Pro 加入到 Feridex 稀释液中, 混合 30 min, 形成 Pro 终浓度为 4 μg/ml, Fe 终浓度为 50 μg/ml 的混合物。标记时, 5 × 10⁵ MSCs 清洗后, 加入上述混合液孵育 4 h。对照组仅加 Feridex, 不加 Pro, 余条件同标记组。

普鲁士蓝染色: 标记与未标记 MSCs 95% 酒精固定 30 min, 再加入 6% 盐酸及 2% 亚铁氰化钾溶液孵育 30 min。显微镜下观察细胞染色情况。

电镜检查: 取 1 × 10⁶ 标记及未标记 MSCs, 2.5% 戊二醛 4℃ 固定 20 min, 0.1 M-二甲腓酸钠缓冲液洗涤, 离心, 1% 锇酸 4℃ 下固定 1 h。梯度丙酮脱水, 超薄切片, 醋酸双氧铀和枸橼酸铅双染色, 透射电镜下观察铁颗粒的分布情况。

体外 MR 检测: 收集 10⁵ 标记与未标记 MSCs, 加入 50 μl 10% 明胶, 制成细胞悬液后采用 Philips Gyroscan Inetra 1.5T 磁共振成像系统、直径 11 cm 环形线圈行 SE 序列 T1WI、T2WI 及 FFE 序列扫描。主要参数: T1WI TR/TE 为 500/15 ms, T2WI TR/TE 为 2500/100 ms, FFE TR/TE/翻转角为 250 ms/14 ms/25°。层厚 1.5 mm, 层间距 0

mm, FOV 10 cm × 10 cm, 矩阵 (256 ~ 308) × 256。

(2) 安全性: 台盼蓝拒染实验测定细胞活力: MSCs 标记后继续培养 1、3、5、7 d 后分别消化离心, 滴加等量的 0.4% 台盼蓝染液, 显微镜下计数细胞存活率, 细胞存活率 = [(总细胞数 - 着色细胞数) / 总细胞数] × 100%。以同数量未标记 MSCs 为对照。

MTT 法测定细胞增殖能力: 标记与未标记 MSCs 以每孔 10⁴ 数目接种于 96 孔培养板中, 于第 1、3、5、7 d 4 个时间点进行检测, 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml) 20 μl, 孵育 4 h, 吸弃上清液, 再加入 150 μl 二甲亚砜, 振荡 10 min 后, 在 492 nm 波长下以酶联免疫检测仪检测各孔吸光度。

Annexin/碘化吡啶 (PI) 双染色法进行细胞凋亡检测: 取 5 × 10⁵ 标记及未标记 MSCs, 冷 PBS 洗涤 3 次, 200 μl 结合缓冲液重悬细胞, 加 AnnexinV-FITC 10 μl 及 PI 5 μl, 室温避光反应 15 min, 冷 PBS 洗涤 1 遍, 加 300 μl 结合缓冲液重悬细胞后, 流式细胞仪上观察。

1.2.2 标记后 MSCs 体内分布

(1) 全脑缺血损伤模型及细胞移植: 按照文献[3]的方法自制心搏骤停和复苏装置, 对 30 只大鼠以持续交流电经右心室内膜致颤, 8 min 无处理心室颤动后给予 6 min 机械胸外按压、同步机械通气进行复苏, 制成大鼠全脑缺血损伤模型。将成模大鼠随机分为标记组及未标记组各 15 只。将 5 × 10⁶ 标记 MSCs 消化离心后, 加入 500 μl PBS 重悬。暴露大鼠颈总动脉, 结扎远心端, 自近心端插入动脉导管, 用微量注射器吸取细胞悬液, 由动脉导管缓慢注入, 持续注射约 2 min 进行移植。

(2) MSCs 移植后的 MR 成像: 于细胞移植后的第 1、2、3、7、14 d, 麻醉大鼠后行肝脏、脾脏 MR 检查。序列为 FFE

表 1 移植后肝、脾与肌肉的 T2*WI 信号强度比

分组		时间(d)				
		1	2	3	7	14
肝脏	标记组	0.53 ± 0.08	0.63 ± 0.03	0.91 ± 0.04	1.05 ± 0.09	1.01 ± 0.07
	未标记组	1.08 ± 0.07	1.06 ± 0.05	0.98 ± 0.07	1.07 ± 0.09	1.06 ± 0.08
脾脏	标记组	0.52 ± 0.10	0.62 ± 0.03	0.69 ± 0.03	1.01 ± 0.04	1.13 ± 0.10
	未标记组	1.04 ± 0.22	1.05 ± 0.05	0.97 ± 0.07	1.00 ± 0.03	1.07 ± 0.05

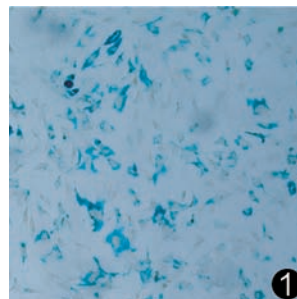


图 1 标记细胞普鲁士蓝染色光镜下几乎全部 MSCs 内可见蓝染的铁颗粒, 标记率约 100% (× 100) 图 2 标记细胞电镜观察 标记 MSCs

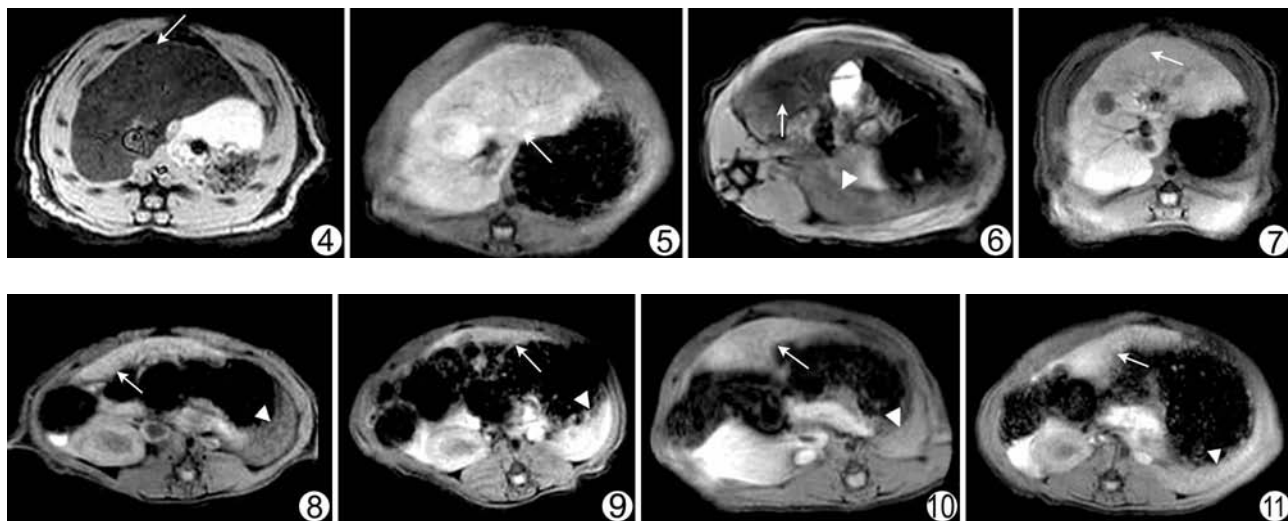


图 4~11 标记与未标记细胞移植后系列 MR 检查 标记 MSCs 移植后第 1 d (图 4)、2 d (图 6), 肝(箭)、脾(箭头) T2*WI 信号均明显减低, 明显低于对照组(图 5: 第 1 d; 图 7: 2 d), 第 3 d, 标记组(图 8)肝脏信号强度与对照组(图 9)相似, 而脾脏信号仍低于对照组; 第 7 d, 标记组肝、脾脏信号均增高(图 10), 与对照组相似(图 11)

T1WI、T2*WI, T1WI:TR/TE/翻转角为 40 ms/7.2 ms/35°, 矩阵 208 × 256, 视野 10 cm × 10 cm, 层厚/层间距 2/0 mm, 采集次数 2。T2*WI: TR/TE/翻转角为 600 ms/10.4 ms/25°, 余参数同 T1WI。于 T2*WI 上观察肝、脾信号强度的变化, 避开血管测量感兴趣区(ROI, 50 个像素以上)肝、脾脏以及同层肌肉的信号强度, 计算二者与肌肉的信号强度比值, 测量三次取平均值。

(3) 组织普鲁士蓝染色: 各时间点 MR 检查结束后, 随机选取 3 只大鼠, 麻醉后进行心脏灌注, 之后取出大鼠肝、脾脏, 4% 多聚甲醛固定后石蜡包埋, 切片, 普鲁士蓝染色 30 min, 随后核固红复染。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 15.0 软件包, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。标记与未标记 MSCs 台盼蓝拒染率、MTT 法吸光度、信号强度比采用方差分析, 组间比较用 LSD 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 磁性标记的可行性和安全性 MSCs 标记后, 全部

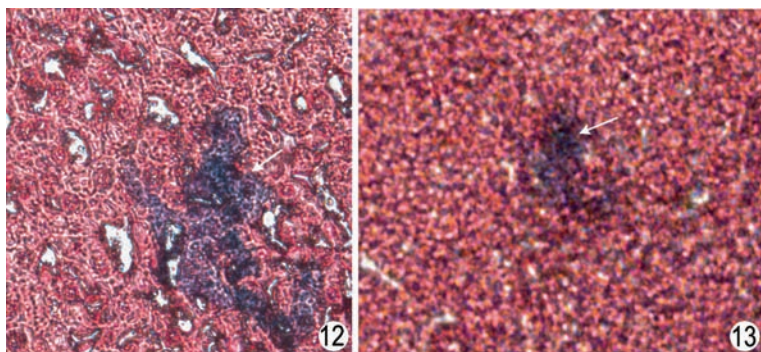


图 12 移植后 1 d 脾脏组织普鲁士染色 脾脏内可见大片状普鲁士蓝染色颗粒(箭, ×400) 图 13 移植后 1 d 肝脏组织普鲁士染色 肝脏组织内可见较弥漫分布的团状普鲁士蓝染色颗粒(箭, ×200)

细胞内出现普鲁士蓝染色颗粒, 标记率近 100% (图 1); 未标记 MSCs 无蓝染铁颗粒。电镜下标记 MSCs 胞浆内及细胞膜上可见大量铁高电子密度颗粒(图 2)。体外 MRI 显示标记 MSCs 信号均降低, 以 T2*WI 最明显(图 3)。

标记与未标记 MSCs 第 1、3、5、7 d 台盼蓝拒染率及 MTT 吸光度各时间点上差异均无统计学意义 ($F = 0.27 \sim 2.06, P > 0.05; F = 0.025 \sim 0.322, P > 0.05$)。标记与未标记 MSCs 的凋亡指数分别为 10.03%、9.98%。

2.2 标记后 MSCs 体内分布 标记 MSCs 移植后, 大鼠肝、脾信号均弥漫性降低, 以 T2*WI 明显, 降低程度随时间逐渐减小(表 1, 图 4~11)。标记组、未标记组肝脏信号强度比在第 1、2 d 与未标记组差异有统计学意义 ($F = 93.40, 317.27, P < 0.05$), 第 3、7、14 d 差异无统计学意义 ($F = 1.62 \sim 4.72, P > 0.05$)。标记组、未标记组脾脏信号强度比在第 1、2、3 d 差异有统计学意义 ($F = 78.49 \sim 240.10, P < 0.05$), 而在第 7、14 d 差异无统计学意义 ($F = 2.14 \sim 3.89, P > 0.05$)。

组织学上, 标记 MSCs 移植后的第 1、2、3 d, 大鼠肝、脾脏内可见大量普鲁士蓝染色阳性细胞(图 12、13), 随时间推移逐渐减少, 第 7 d 肝脾内可见稀疏的蓝染细胞, 第 14 d 更加稀少。未标记组各时间点肝、脾脏内均未见蓝染细胞。

3 讨论

MRI 已广泛应用于干细胞移植后的示踪^[6-8]。Fe 类对比剂因粒径小、弛豫率高、可利用普鲁士蓝染色进行验证而被广泛应用^[7-8]。既往研究多采用多聚赖氨酸作为载体^[7-8], 但目前仍未被批准用于人体。肝素拮抗剂鱼精蛋白临床应用广泛, 本研究利用其将 Feridex 转入细胞内, 实现 MSCs 的磁标记, 标记率达 100%, 标记后 MSCs 活力、增殖能力及凋亡均未受影响, 说明标记方法安全有效。

MSCs 局部移植作用范围小, 且易造成脑的二次

损伤。血管内注入 MSCs 具有分布更广、可移植细胞数多等诸多优点,尤其适用于较广泛的脑缺血^[1],但移植细胞可同时分布于肝、脾、骨髓、肺等脏器。目前对静脉内移植干细胞在脏器的分布已有部分报道。陈东平等^[2]采用荧光显像检测到大鼠移植 MSCs 后分布在骨髓、脾脏、肺等脏器;Devine 等^[5]报道 MSCs 移植后可分布在胃肠组织;二者均系采用静脉移植及离体病理等有创方法去示踪细胞的分布。由于静脉移植 MSCs 经过心肺循环,使其全身分布更加复杂,因此,寻求无创性方法活体示踪动脉移植后的干细胞的分布具有重要意义。

本研究在前期基础上,通过颈总动脉移植 MSCs,MR 动态检测肝、脾信号改变,在活体水平了解 MSCs 在肝、脾内的分布及代谢情况,发现移植后肝、脾内出现大量的标记细胞,随时间逐渐减少,MRI 能够示踪 2 d 内肝脏信号的弥漫减低、3 d 内脾脏信号的弥漫减低,与 PET 示踪 MSCs 移植后肺、脾、肝等部位的分布基本一致^[9]。本研究亦发现肝脏信号减低的恢复较脾脏为快,具体机制未明,可能与血液循环中细胞随机分布、肝脏比脾脏更富血供有关;脾脏内存在间充质祖细胞和支持造血的间质细胞^[4],可能是脾脏信号减低程度较肝脏轻而恢复时间稍晚的原因之一。

总之,本研究表明,可采用鱼精蛋白对 MSCs 进行安全有效的磁标记,标记的 MSCs 经颈总动脉移植后较快地分布于肝脏和脾脏内,随时间推移而逐渐减少;利用 MRI 对经动脉移植的干细胞的分布进行监测,有利于今后在用 MSCs 移植治疗靶器官疾病时选择合适的移植途径,对提高靶器官内干细胞分布数量及治疗效果具有较大的意义。

[参考文献]

- [1] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscienc*, 2006, 137(2): 393-399.
- [2] Chen DP, Zhang ZJ, Wu XL, et al. Distribution of intravenously grafted bone marrow mesenchymal stem cells in the viscera tissues of rats before and after cerebml ischemia. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2007, 11(50): 10160-10164.
- [3] Fu Y, Fang XS, Wang T, et al. A novel mechanical device for the resuscitation of cardiac arrest in the rat model of CPR. *Chin J Emerg Med*, 2007, 16(4): 387-389.
- [4] Ailers C, Sierralta WD, Neubauer S, et al. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation*, 2004, 78(4): 503-508.
- [5] Devine SM, Cobbs C, Jennings M, et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 2003, 101(8): 2999-3001.
- [6] Shen J, Zhou CP, Cheng LN, et al. Gadolinium and fluorescent bifunctionally labeling and in vitro MR imaging of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Chin J Radiol*, 2008, 42(4): 426-431.
- [7] Sun JH, Teng GJ, Ju SH, et al. MR imaging of implanted magnetically labeled rat bone marrow mesenchymal stem cells in normal kidney. *Chin J Med Imaging Technol*, 2006, 22(2): 205-208.
- [8] Zheng MW, Huan Y, Xu J, et al. In vitro MR imaging of superparamagnetic iron oxide labeled mesenchymal stem cells. *Chin J Med Imaging Technol*, 2006, 22(8): 1129-1134.
- [9] Ma B, Hankensn KD, Dennis JE, et al. A simple method for stem cell labeling with fluorine 18. *Nuclear Medicine and Biology*, 2005, 32(7): 701-705.

[1] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscienc*, 2006, 137(2): 393-399.

[2] Chen DP, Zhang ZJ, Wu XL, et al. Distribution of intravenously grafted bone marrow mesenchymal stem cells in the viscera tissues of rats

孙军辉,滕皋军,居胜红,等.磁标记大鼠肾脏骨髓间充质干细胞移植 MR 成像研究. *中国医学影像技术*, 2006, 22(2): 205-208.

[8] Zheng MW, Huan Y, Xu J, et al. In vitro MR imaging of superparamagnetic iron oxide labeled mesenchymal stem cells. *Chin J Med Imaging Technol*, 2006, 22(8): 1129-1134.

郑敏文,宦怡,徐健,等.超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞的磁共振成像研究. *中国医学影像技术*, 2006, 22(8): 1129-1134.