

## 论 著

## MR示踪磁标记脐带间充质干细胞脑移植的实验研究\*

1. 北京大学深圳医院神经内科

2. 北京大学深圳医院影像科

(广东 深圳 518036)

周芬莉<sup>1</sup> 戚玉龙<sup>2</sup> 毛立军<sup>1</sup>吕金华<sup>1</sup> 吴 军<sup>1</sup>

【摘要】目的 研究干细胞移植后活体内无创示踪方法的价值。方法 菲立磁标记人脐带间充质干细胞移植到大鼠蛛网膜下腔,核磁共振成像示踪干细胞。结果 移植的干细胞通过菲立磁标记后可在核磁共振成像下显示踪迹,并可从蛛网膜下腔迁移至脑实质内。结论 核磁共振成像可活体无创显示菲立磁标记的干细胞的迁移,磁敏感加权成像(susceptibility-weighted imaging, SWI)示踪效果优于核磁共振T2WI平扫。

【关键词】脐带间充质干细胞; 菲立磁; 无创示踪; 核磁共振; 磁敏感加权成像

【中图分类号】R68; R32

【文献标识码】A

【基金项目】深圳市科技创新委员会(JCYJ20150403091443311)

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5131.2018.10.001

通讯作者: 周芬莉

## In Vivo Tracing of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Labelled by Feridex in Murine Brain\*

ZHOU Fen-li, QI Yu-long, MAO Li-jun, et al., Department of Neurology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China

[Abstract] **Objective** To explore the value of noninvasive tracing of transplanted stem cells in vivo. **Methods** Feridex labelled umbilical mesenchymal stem cells were transplanted into murine subarachnoid space, and traced by MR. **Results** Feridex labelled stem cells can immigrate into cerebral tissue, and can be traced in vivo by MR. **Conclusion** MR can demonstrate the immigration of Feridex labelled stem cells into murine brain. The tracer effect of SWI was superior to T2WI.

[Key words] Umbilical Mesenchymal Stem Cell Feridex; In Vivo Tracing; Magnetic Resonance Image; Susceptibility-weighted Imaging(SWI)

到目前为止,急性缺血性卒中仍是致死、致残率高的常见病。时间窗内血管再通治疗是唯一特效的治疗方法,但即使优化溶栓流程后,总体静脉溶栓或介入取栓率仍然较低,导致很多的患者致残。除了血管再通治疗,卒中后的神经功能重建也是重要的治疗手段。神经功能重建主要有两种方法,一种是神经康复治疗,另外一种干细胞移植。利用干细胞的多向分化潜能,使神经系统结构重建,最终实现功能重建。但是目前干细胞移植尚停留在实验室阶段,没有进入临床的主要原因是,移植进入人体的干细胞的存活时间、迁移和分化均难以人为控制。本实验主要观察移植干细胞在大鼠体内的无创示踪。核磁共振技术是临床常用于卒中患者的检查方法,具有无创性、可重复,是较理想的监测手段,所用的示踪剂是临床常用于内皮网状系统显影的菲立磁,是一种超顺磁性氧化铁(Superparamagnetic Iron Oxide, SPIO)粒子,在常规的1.5T核磁上就能探测到。本研究拟将菲立磁标记于移植的干细胞胞浆内,通过核磁对磁性颗粒的显像来示踪移植的干细胞。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料和仪器** 实验动物采用清洁级雄性SD大鼠,体重200~250g,购自中山大学医学院动物实验中心。实验过程符合动物伦理学。主要试剂和材料:菲立磁(Feridex IV, 11.2 mg/mL,美国advanced magnetic公司);培养基DMEM/F12(GIBCO,含L-谷氨酰胺);硫酸鱼精蛋白(上海生化);IV型胶原酶(Sigma)。仪器:细胞培养箱(REVCO ELITE II);倒置显微镜(LEICA DMIRB,德国徕卡公司);数码显微成像系统(OLYMPUS DP70,日本OLYMPUS公司);核磁共振(西门子AVANTO 1.5T MR)。

**1.2 脐带间充质干细胞采集培养** 征得产妇同意后取产科足月健康新生儿废弃的脐带1cm,无菌条件下浸入PBS中,4℃保存;PBS洗涤后,剔除脐静脉、动脉,无需剔除羊膜。加入少量H-DMEM培养基湿润后剪碎。加入5倍体积的0.1%IV型胶原酶,放在培养箱消化1小时。PBS稀释3倍后,用100目细胞筛网过筛。离心:1600rpm,10min。细胞沉渣接种于DMEM/F12全培养基(图1)。4天后,全量换液。以后每3天换液

1次,至细胞融合传代。P4代干细胞备用于磁标记(图2)。

### 1.3 菲立磁标记脐带间充质干细胞

菲立磁0.05mL加5%GS0.45mL稀释为浓度1.12mg/mL,取0.5mL稀释后的菲立磁液体加入5.1mL的全培养基中(浓度0.1mg/mL),再对半加入全培养基至菲立磁浓度为0.05mg/mL。硫酸鱼精蛋白0.1mL加无菌注射用水0.9mL稀释为浓度1mg/mL。稀释后的鱼精蛋白0.028mL加入11.2mL的含菲立磁的全培养基中(浓度0.05mg/mL),手动摇匀3分钟。P4代脐带间充质干细胞加入含菲立磁的全培养基5mL/瓶。培养箱孵化过夜,吸去培养基,PBS洗涤1次,PBS加10U/mL的肝素再洗涤1次,进行普鲁士蓝染色显示蓝色铁颗粒在胞浆内(图3)。磁标记后的干细胞消化离心后加入生理盐水重悬为107cell/ml备用。

### 1.4 MR成像

SD大鼠分为两组:正常对照组、移植组。移植组大鼠麻醉后经枕大池注射0.1mL菲立磁标记的脐带间充质干细胞悬液,正常对照组同样方法注入等量的生理盐水。行大鼠头颅核磁成像时,大鼠俯卧,用腕关节线圈,行横断面SE T1, SE T2及SWI序列。参数:FOV 130, Phase 49.5, 层厚:3mm, Average:6。T2:翻转角:150;基础分辨率:384;分辨:768×266;相位方向:70%;TR 4000, TE 105, T1:翻转角:90;基础分辨率:256;分辨:512×192;相位方向:75%;TR 400, TE 12。

## 2 结果

浓度为0.05mgFe/mL的菲立磁—硫酸鱼精蛋白复合物用于脐带间充质干细胞的标记率接近100%,标记效果好,细胞内的铁颗粒含量较高。短时间继续培养细胞活性保持良好。1.5T核磁共振

对大鼠颅脑成像清晰度较高。T2WI成像可以显示标记于干细胞内的菲立磁铁颗粒。移植早期(第三天),核磁显示菲立磁颗粒主要集中在环池周围的蛛网膜下腔。移植后2周T2WI对菲立磁颗粒的显示信号明显变弱,但磁敏感加权成像SWI仍可检测到菲立磁信号,并且显示这些颗粒已经从蛛网膜下腔迁移进入了脑实质内部,信号较前分散减弱。

## 3 讨论

磁共振成像技术对磁性物质较敏感,特别是磁敏感加权成像SWI利用磁敏感性差异形成增强对比<sup>[1]</sup>,磁性颗粒信号会得到放大,通过标记磁性物质,可以进行MR显影下的细胞示踪。根据磁性标记物的不同和标记方法的不同,细胞磁标记主要分为细胞外标记和细胞内标记两种,细胞外标记较容易被吞噬细胞清除,细胞内磁标记的生物相容性较好,保留时间较长。最常用的细胞内标记物是菲立磁(Feridex),是一种超顺磁性颗粒,是临床常用的诊断试剂,临床上主要用于内皮网状系统的显影,作为诊断试剂的菲立磁浓度远大于50 μg/mL,对于人体仍然是安全的。

MR所显示的信号对比强度与磁标记干细胞的标记效率有关。研究认为磁标记的效率与细胞的数量、标记浓度和孵育时间呈正相关。文献中SPIO-PLL复合物标记干细胞的浓度通常是20~50 μg/mL。有研究认为25 μg/mL铁已经达到了标记干细胞所需要的饱和浓度,在此浓度可有效标记细胞97~100%,超过50 μg/mL浓度可使细胞的变形增殖能力受到不同程度的抑制<sup>[2]</sup>。有研究认为当浓度大于22.4 μg/mL时,SPIOs影响干细胞的存活和分化<sup>[3]</sup>。也有研究认为100 μg/

mL以下浓度标记干细胞是安全的<sup>[4]</sup>。我们在实验过程中发现孵育1小时即可见到菲立磁颗粒进入细胞质,过夜后细胞的标记率几乎可以达到100%,但是胞质内铁颗粒的含量却不尽相同,短时间继续培养细胞生长仍然良好。有研究用50 μg/mL的浓度标记3天,胞质内铁含量达到最高饱和度(24.9±0.6)pg/cell,但随着时间的延长,细胞增殖分裂,胞内铁含量会下降<sup>[5]</sup>。有研究显示应用1.5T的核磁检测铁含量(16.4±3.1)pg/cell的细胞,核磁T1WI、T2WI能检测到的最小数量级细胞分别为2×10<sup>4</sup>, 1×10<sup>4</sup><sup>[6]</sup>。SWI检测磁差异敏感性高于常规的T1WI、T2WI,因此对于迁移分散后磁性信号减弱后的干细胞示踪效果可能优于常规的核磁T2加权相,本实验结果也验证了这一点。

既往国内外有一些相关干细胞示踪研究,这些研究使用的主要是骨髓间充质干细胞或神经干细胞<sup>[7-11]</sup>,相对而言,脐带间充质干细胞从废弃的脐带中提取,含量丰富,更容易获得,并且分化能力强、免疫原性低,性能稳定,成瘤性极低<sup>[12]</sup>,适宜进行异体间干细胞移植。国内外报道的MR示踪磁标记干细胞中枢神经系统移植大都是在立体定位仪下,脑实质局部注射进行移植<sup>[13-14]</sup>。但是这种移植方式本身具有创伤性。注射细胞数量也受到限制,通常只能注入数微升细胞液。枕大池移植无需立体定位仪,较为方便,既保证了干细胞进入颅内,又避免穿刺导致的脑实质的直接损伤,并且可注入较大数量级别的细胞,本研究中注入了106数量级的干细胞,是立体定位下脑局部注射量的百倍,在常规T2WI上可见到早期聚集在环池的磁标记干细胞的明显的低信号改变。(下转第34页)