研究论文

三种不同转染剂介导钆喷酸葡胺标记人脐带间充质 干细胞及体外MR成像的实验研究

帅翰林¹ 林孝文¹ 史长征² 宋 泓¹ 罗 新^{1*} 朱小华¹ (¹暨南大学附属第一医院妇产科,广州 510630; ²暨南大学附属第一医院医学影像中心,广州 510630)

摘要 人脐带组织富含间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs), 是干细胞研究理想的种子来源,如何从脐带组织中分离间充质干细胞及运用影像技术示踪干细胞生 物学行为是当前研究的热点。该实验应用组织块贴壁法从足月孕如脐带组织中分离纯化间充质干细 胞并进行鉴定,结果为hUCMSCs。进一步应用磷酸钙、Effectene、脂质体2000三种转染试剂分别介 导Gd-DTPA标记hUCMSCs,通过MRI(magnetic resonance imaging)检测钆喷酸葡胺(Gd-DTPA)标记细 胞信号强度变化及细胞内钆离子浓度的测定评价三种转染试剂的转染能力,最终发现在三种转染试 剂中,Effectene介导Gd-DTPA标记hUCMSCs效果最佳,为Gd-DTPA标记干细胞体外MR成像奠定了实 验基础。

关键词 间充质干细胞;磁共振成像;示踪

In Vitro Study of Gadopentetate Acid Dimeglumine Labeled Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Mediated by Three Different Transfection Agents Tracking under MR

Shuai Hanlin¹, Lin Xiaowen¹, Shi Changzheng², Song Hong¹, Luo Xin^{1*}, Zhu Xiaohua¹ (¹Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630; ²Medical Image Center, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630)

Abstract Human umbilical cord tissue contains plenty of mesenchymal stem cells, which is the ideal stem cell seed source. How to isolate mesenchymal stem cells from umbilical cord and trace the biological behavior of stem cells by image techniques are current research focuses. The hUCMSCs from full-term pregnant women's umbilical cord tissues were separated, purified and identified in this research. Furthermore, Gd-DTPA was transfected into mesenchymal stem cells through calcium phosphate, Effectene and Lipofectamine 2000. The change of labeled cell's signal strength was detected by MR and the gadolinium ion concentration intra celluar were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for evaluation of the transfection capacity of three reagents. In conclusion, the method of Effectene mediated Gd-DTPA marker hUCMSCs is best and this study provides the experimental foundation for Gd-DTPA labeled stem cells *in vitro* MR.

Key words mesenchymal stem cells; magnetic resonance imaging; tracking

收稿日期: 2013-11-25 接受日期: 2014-03-31

国家自然科学基金(批准号: 81070459)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 020-38688768, E-mail: piao19751981@163.com

Received: November 25, 2013 Accepted: March 31, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81070459)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-20-38688768, E-mail: piao19751981@163.com

网络出版时间: 2014-06-04 14:18 URL: http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0330.html

人脐带间充质干细胞是一类具有自我更新和 多向分化潜能的细胞,相对其他间充质干细胞,其 来源丰富,取材方便,分化增殖能力强,且低免疫原 性和无致瘤性,不涉及社会、伦理及法律方面的诸 多争论,其临床应用前景广阔,已经成为干细胞研 究和临床应用理想的种子细胞。本实验在成功从 人脐带组织中分离培养hUCMSCs的基础上,探讨三 种不同转染试剂介导钆喷酸葡胺(gadopentetate acid dimeglumine, Gd-DTPA)标记hUCMSCs的能力,筛 选出转染最佳的试剂,为下一步利用Gd-DTPA标记 hUCMSCs并进行体外MRI示踪研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

脐带标本均取自暨南大学附属第一医院足月 剖宫产健康新生儿脐带组织(符合医院伦理委员会 规定并经家属同意)。原子力显微镜购自美国热电 公司;超净工作台购自苏州净化设备总厂;倒置相差 显微镜购自日本Olympus;流式细胞仪购自美国BD 公司;茜素红和油红O染液购自广州斯佳生物科技 公司;电感耦合等离子体发射光谱仪购自美国PE公 司;钆喷酸葡胺注射液购自德国拜耳公司;磷酸钙转 染试剂购自江苏碧云天生物技术研究所;Effectene 购自Qiagen公司;脂质体2000购自Invitrogen公司; 1.5T HDXT MR购自美国GE公司。

1.2 方法

1.2.1 hUCMSCs的体外分离和培养 无菌条件下 收集脐带,组织块贴壁法分离、纯化hUCMSCs,待 细胞达到80%~90%融合时,以1:2或1:3比例传代培 养。常规方法制作标本,用原子力显微镜在室温下 对细胞进行成像。

1.2.2 hUCMSCs生长曲线的绘制 第3代细胞接种 于24孔培养板中,每孔细胞数约为4000个。接种后的 8 d内,每天相同时间任意取三个孔消化细胞,制成单 细胞悬液,应用血细胞计数仪在倒置显微镜下计数细 胞。记数法检测细胞增殖能力并绘制细胞生长曲线。

1.2.3 流式细胞仪检测hUCMSCs表型和细胞周期 0.25%胰蛋白酶消化待检第3代细胞,PBS洗涤3次, 制成单细胞悬液。流式细胞仪检测细胞表面标志 物CD29、CD44、CD90、CD105、CD40、CD45 和HLA-DR的表达; 经胰蛋白酶消化待检第3代细 胞,制成5×10⁵/mL的细胞悬液,流式细胞仪检测细 胞周期。

1.2.4 hUCMSCs多向分化能力的检测 生长状态 良好的第三代细胞接种于六孔板中,用完全培养基 培养细胞长至80%~90%融合时,更换分化诱导培养 基并分别设对照组。向成脂细胞诱导分化:实验组 加入成脂细胞诱导液(含10%胎牛血清,10 μg/mL胰 岛素,1 μmol/L地塞米松,0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲 基黄嘌呤,100 U/mL青霉素,100 U/mL链霉素的LG-DMEM培养液),每3 d全量换液一次,诱导至第21 d 作油红"O"染色。向成骨细胞诱导分化:实验组加 入成骨细胞诱导液(10%胎牛血清,100 nmol/L地塞 米松,10 mmol/L β-甘油磷酸钠,0.2 mmol/L地塞 米松,10 u/mL青霉素,100 U/mL链霉素的DMEM/F12 培养液),每3 d全量换液一次,诱导至第21 d作茜素 红染色。

1.2.5 三种转染剂介导钆离子标记hUCMSCs 取 1瓶T25第3代细胞,待细胞长到70%~80%融合时,分 别使用磷酸钙、Effectene、脂质体2000三种转染剂 介导钆离子进入干细胞,并设置对照组。(1)磷酸钙 转染方法:转染细胞前1h更换新鲜不含抗生素的完 全培养基5 mL, 30 μL Gd-DTPA加入260 μL氯化钙 中, 混匀后, 加入260 µL BBS溶液中, 摇匀, 室温孵育 10~20 min后加入到T25培养瓶中,在37 °C、5% CO2 的培养箱内培养4 h, PBS洗涤细胞3次, 胰酶消化并 收集细胞沉淀于EP管中, 置入一装有水的塑料容器 中行MR成像,测定信号强度。(2)按标准操作流程 分别以Effectene、脂质体2000为转染剂转染钆离子, 并行MR成像,测定信号强度。以上三种磁标记细胞 行MR后,裂解细胞并应用电感耦合等离子体原子发 射光谱法测定转染入细胞内钆离子的浓度。

1.2.6 MR成像序列采用 1.5T临床型磁共振扫 描仪, 8通道腕关节线圈, 成像参数如下: SE T1WI 序列: TR分别是300, 600, 900, 1 200 ms; TE=15 ms, 层距/层厚=1.0/0 mm, 矩阵为256×256像素, 视图为 12 cm×9 cm, 信号采集次数为2次; SE T2WI序列: TR/TE=1500/88 ms, 层距/层厚=1.0/0 mm, 矩阵为 384×192像素, 视图为12 cm×12 cm, 信号采集次数为 2次。利用GE AW4.5工作站测量细胞的信号强度, 感兴趣区取1 mm×1 mm。

1.3 统计分析

所有实验数据以*x*±s表示,用SPSS 13.0统计 软件进行分析, *P*<0.05认为差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 hUCMSCs的分离培养及形态特征

应用组织块贴壁法,1周后可见成纤维状细胞 从组织块周围爬出,呈集落式生长。传代后的细胞 呈成纤维样细胞均匀分布在培养瓶中。倒置相差显 微镜下观察,刚传代的细胞呈球形,悬浮在培养基 中,24 h后基本贴壁,形态呈短杆状或长梭状。经过 多次换液及传代,hUCMSCs得到了纯化,传代细胞 形态均一(图1),增殖速度明显加快,一般3~4 d能达 到80%融合,可继续消化传代。原子力显微镜下观 察hUCMSCs大部分呈长梭性,细胞质和细胞核分界 明显,可见到明显的核仁。细胞体积很大,长度超过 100 µm,且细胞向四周伸出数量不等的突起(图2)。

2.2 hUCMSCs的生长曲线

hUCMSCs的生长曲线略呈"S"形(如图3)。接种后第1~4 d, 细胞生长缓慢, 处于生长潜伏期; 第4 d起细胞大量增殖, 进入对数生长期, 第6 d后细胞生长速度逐渐减慢, 进入平台期。

2.3 hUCMSCs表面标志物的鉴定

应用流式细胞仪检测发现,第三代hUCMSCs高 表达CD29、CD44、CD90、CD105,而造血细胞表 面标志物CD45与移植免疫排斥密切相关的表面标 志CD40、HLA-DR均为阴性表达(图4)。

2.4 hUCMSCs多向分化能力的鉴定

成脂诱导5 d左右,细胞逐渐由原来的长梭形变 为纺锤形或椭圆形,21 d时胞质内可见脂滴形成,油 红"O"染色呈强阳性(图5)。对照组细胞形态未见明 显变化,油红"O"染色未见脂滴形成。

成骨诱导5 d左右,细胞逐渐由原来的长梭形变 为多边形或方形,局部可见细胞呈聚集生长。诱导



图1 hUCMSCs第三代细胞(40×) Fig.1 The third passage of hUCMSCs (40×)

第21 d进行茜素红染色, 在细胞密集区可见染成红色的矿化质结节(图6)。

2.6 三种转染剂介导Gd-DTPA标记细胞后的体 外MR成像

三种转染剂转染钆离子进入细胞后,收集细胞(1×10⁶个细胞)进行MRI扫描。测量T1WI序列细胞的信号强度,Gd-DTPA标记的hUCMSCs在T1WI为亮白高信号(图7),T2WI为低信号(图8);未标记细胞在T1WI及T2WI均为低信号。测得磷酸钙、Effectene、脂质体2000三组信号强度分别为: 2281.2±118.8、2031.9±59.7、1887.4±40.8,空白对照组细胞的信号强度为:1306.7±52.0。经完全随机设计资料的方差分析,四组均数间差异均有统计学意



图2 hUCMSCs的原子力显微镜细胞扫描 Fig.2 The Atomic force microscope topography of hUCMSCs









图5 hUCMSCs成脂细胞诱导后油红"O"染色阳性(200×) Fig.5 The adipogenic differentiation of hUCMSCs identified by oil red "O" staining (200×)



1: 磷酸钙组; 2: Effectene组; 3: 脂质体2000组; 4: 空白对照组。 1: MR imaging of Gd-DTPA marker hUCMSCs mediated by Calcium phosphate; 2: MR imaging of Gd-DTPA marker hUCMSCs mediated by Effectene; 3: MR imaging of Gd-DTPA marker hUCMSCs mediated by Lipofectamine 2000; 4: MR imaging of Gd-DTPA marker hUCMSCs without transfection agent.

图7 不同转染剂介导Gd-DTPA标记hUCMSCs的 MR信号强度(T1WI) Fig.7 MR imaging of Gd-DTPA marker hUCMSCs mediated by different transfection agent (T1WI)



图6 hUCMSCs成骨细胞诱导后茜素红染色阳性(200×) Fig.6 The osteogenic differentiation of hUCMSCs identified by Alizarin red staining (200×)



1: 磷酸钙组; 2: Effectene组; 3: 脂质体2000组; 4: 空白对照组。 1: MR imaging of Gd-DTPA marker hUCMSCs mediated by Calcium phosphate; 2: MR imaging of Gd-DTPA marker hUCMSCs mediated by Effectene; 3: MR imaging of Gd-DTPA marker hUCMSCs mediated by Lipofectamine 2000; 4: MR imaging of Gd-DTPA marker hUCMSCs without transfection agent.

图8 不同转染剂介导Gd-DTPA标记hUCMSCs的 MR信号强度(T2WI) Fig.8 MR imaging of Gd-DTPA marker hUCMSCs mediated by different transfection agent (T2WI)



Fig.9 Gadolinium ion concentration measurement of hUCMSCs by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry

义(F=93.1, P<0.05)。说明三种转染剂成功转染Gd-DTPA进入干细胞。

2.7 应用电感耦合等离子体原子发射光谱法测定 干细胞内钆离子的浓度

磷酸钙、Effectene、脂质体2000三组细胞内钆离 子的浓度分别为:0.178±0.009 mg/L、0.158±0.003 mg/L、 0.120±0.002 mg/L,经完全随机设计资料的方差分 析,三组均数间差异均有统计学意义(P<0.05)(图9)。

3 讨论

间充质干细胞的鉴定主要依据细胞的形态、表 面标志物及多向分化能力综合判断。本实验采用组 织块贴壁法从人脐带中分离培养获得一种成纤维样 细胞,该细胞具有很强的增殖能力,原代培养2周左 右便可传代,传代两三次后得到纯化的长梭形细胞, 可在体外长期稳定培养。从细胞的生长曲线可以看 出细胞增殖经历三个时期即潜伏期、对数生长期和 平台期,对数生长期的细胞活力好、增殖能力强,因 此在此期宜于进行细胞的常规传代及相关实验研 究。国际细胞治疗协会^{[11}认为体外培养的间充质干 细胞必须满足以下条件:细胞贴壁生长;细胞免疫表 型中CD105、CD73、CD90的阳性率必须大于95%, 而CD45、CD34、CD14、CD19和HLA-DR的阳性 率必须小于2%;具有分化为成骨细胞、成肪细胞和 软骨细胞的能力。本实验所培养的细胞满足上述条 件,因此我们认为本实验从人脐带分离的成纤维样细胞属于hUCMSCs。

近年来, 干细胞移植治疗效果已在动物实验和 部分临床实验中得到肯定^[2-6]。干细胞移植后需了解 其在体内的存活、分布、迁徙和分化等生物学行为, 这对于评估干细胞的移植效果有重要意义。国内外 大量研究表明, MRI是活体示踪细胞的最佳方法^[7-8]。 因此, 本实验即应用1.5T MRI对不同转染试剂介导 Gd-DTPA标记的hUCMSCs进行成像研究。

应用MRI示踪移植细胞,就必须在移植前有效标记细胞。目前,最常用的磁共振对比剂包括钆螯合物、超顺磁氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)两大类。钆螯合物是一种顺磁性磁共振对比剂,通过缩短T1使MRI信号在T1WI显示为高信号。Daldrup-Link等^[9]认为,与SPIO相比,Gd-DTPA更加有助于转染。根据药代动力学研究,Gd-DTPA标记的靶向细胞如发生损伤或凋亡,将会在24 h内排出体外,此外,Gd-DTPA标记的干细胞在T1WI显示为高信号,易于与细胞周围的低信号组织区分,对比增强效果好。因此,Baligand等^[10]不提倡使用SPIO作为示踪剂,而推荐使用Gd-DTPA。Shen等^[11]报道选用Gd-DTPA 30 µL即可有效标记干细胞,标记率达90%,且无细胞毒性,本实验即采用此量钆喷酸葡胺标记细胞。

细胞膜表面及Gd-DTPA都带负电荷,未经表面 修饰的Gd-DTPA很难进入细胞,必须借助载体。本 实验选择磷酸钙、Effectene和脂质体2000三种转染 剂转染Gd-DTPA进入干细胞,通过MRI信号强度和 电感耦合等离子体原子发射光谱法两种方法筛选转 染Gd-DTPA效率最佳的转染剂。Gd-DTPA标记的干 细胞在T1WI上呈现高信号,转染效率越高,细胞内 钆离子含量就越多,引起的磁化效应就越强, MRI信 号改变就越明显。通过MRI信号强度检测,经方差 分析,磷酸钙组、Effectene组、脂质体2000组、空 白对照组四组均数间差异均有统计学意义(P<0.05), 磷酸钙组信号最强(2 281.2±118.8), 其次为Effectene 组。转染剂转染效率越高,利用电感耦合等离子体 原子发射光谱法测定细胞内钆离子的浓度就越高, 经方差分析,磷酸钙组、Effectene组、脂质体2000组 三组均数间差异均有统计学意义(P<0.05),磷酸钙组 钆离子的浓度最高,脂质体2000组钆离子的浓度最

低,与MRI信号强度检测结果相符。通过以上两种方 法得出磷酸钙转染钆离子的效率最高,但在实验过 程中发现磷酸钙组,如转染孵育细胞时间控制不好, 易形成磷酸钙微小沉淀,从而影响细胞状态。

综上所述,采用组织块贴壁法能从人脐带中获得间充质干细胞,在上述三种不同的转染介质中, Effectene是转染Gd-DTPA标记脐带间充质干细胞效果最佳的试剂,该实验为脐带间充质干细胞体外 MRI成像示踪和进一步的活体实验奠定了基础。

参考文献 (References)

- de Schauwer C, Meyer E, van de Walle GR, van Soom A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: A plea for uniformity. Theriogenology 2011; 75(8): 1431-43.
- 2 Maijenburg MW, Gilissen C, Melief SM, Kleijer M, Weijer K, Ten Brinke A, *et al.* Nuclear receptors Nur77 and Nurr1 modulate mesenchymal stromal cell migration. Stem Cells Dev 2012; 21(2): 228-38.
- 3 Zhang MJ, Sun JJ, Qian L, Liu Z, Zhang Z, Cao W, et al. Human umbilical mesenchymal stem cells enhance the expression of neurotrophic factors and protect ataxic mice. Brain Res 2011; 1402: 122-31.
- 4 Wang L, Ott L, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. Musculoskeletal tissue engineering with human umbilical cord

mesenchymal stromal cells. Regen Med 2011; 6(1): 95-109.

- 5 Yang X, Zhang M, Zhang Y, Li W, Yang B. Mesenchymal stem cells derived from Wharton jelly of the human umbilical cord ameliorate damage to human endometrial stromal cells. Fertil Steril 2011; 96(4): 1029-36.
- 6 Neuss S, Schneider RK, Tietze L, Knüchel R, Jahnen-Dechent W. Secretion of fibrinolytic enzymes facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots. Cells Tissues Organs 2010; 191(1): 36-46.
- 7 Kim D, Hong KS, Song J. The present status of cell tracking methods in animal models using magnetic resonance imaging technology. Mol Cells 2007; 23(2): 132-7.
- 8 Bos C, Delmas Y, Desmoulière A, Solanilla A, Hauger O, Grosset C, *et al. In vivo* MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. Radiology 2004; 233(3): 781-9.
- 9 Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, Settles M, Piontek G, Metz S, *et al.* Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. Radiology 2003; 228(3): 760-7.
- 10 Baligand C, Vauchez K, Fiszman M, Vilquin JT, Carlier PG. Discrepancies between the fate of myoblast xenograft in mouse leg muscle and NMR label persistency after loading with Gd-DTPA or SPIO. Gene Ther 2009; 16(6): 734-45.
- 11 Shen J, Cheng LN, Zhong XM, Duan XH, Guo RM, Hong GB. Efficient *in vitro* labeling rabbit neural stem cell with paramagnetic Gd-DTPA and fluorescent substance. Eur J Radiol 2010; 75(3): 397-405.