

❖ 实验研究

Application of multimodal imaging in vivo monitoring transplanted mesenchymal stem cells

HU Yue, PENG Tao, HUANG Mingsheng, JIANG Zaibo, LI Ming'an, HE Li, WU Chun*

(Department of Interventional, the Third Affiliated Hospital, Institute of Interventional Radiology Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

[Abstract] **Objective** To explore the ability of combining bioluminescence imaging (BLI) and MRI to make real-time and non-invasive tracer of mesenchymal stem cells (MSCs) transplanted into damaged liver of rats; and to study the functional repair effect of transplanted MSCs on injured liver in rats. **Methods** Rat model with acute liver injury were transplanted the MSCs of labeled luciferase and SPION. Rat plasma aminotransferase levels and liver pathology change were analyzed, and the repair effect of MSCs on liver function injury were observed. The time course of MSCs accumulation in rat liver was observed by BLI and MRI. In situ immunohistochemical staining of rat liver tissue sections was performed. **Results** Plasma aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels were significantly lower on days 5, 9 and 10 after transplantation than in the control group (all $P < 0.05$). On the first day after the transplantation of MSCs, the bioluminescence intensity in the liver area of rats was significantly enhanced, and the T2* WI standardized signal intensity was significantly reduced, and then gradually returned to the pre-transplantation level 10 days after the transplantation. The number of luciferase-positive MSCs decreased with the decrease of bioluminescence intensity. **Conclusion** Transplantation of MSCs has a good repair effect on the damaged liver function of rats. In addition, BLI combined with MRI is used for real-time and non-invasive tracing of MSCs transplanted into the injured liver of rats.

[Keywords] liver; rats; mesenchymal stem cells; bioluminescence; magnetic resonance imaging

DOI:10.13929/j.1003-3289.201903130

多模态成像对间充质干细胞移植后活体示踪的应用研究

胡 越, 彭 焘, 黄明声, 姜在波, 李名安, 贺 立, 吴 春*

(中山大学附属第三医院介入科 介入放射学研究所, 广东 广州 510630)

[摘要] **目的** 探讨生成像(BLI)和MRI相结合对移植入大鼠损伤肝脏内的间充质干细胞(MSCs)的实时、无创示踪的能力及移植的MSCs对大鼠损伤肝脏的功能修复作用。**方法** 对急性肝损伤大鼠模型移植标记了荧光素酶和SPION的MSCs,分析大鼠的血浆转氨酶水平及肝脏病理学改变,观察MSCs对肝功能损伤的修复作用,并利用BLI和MRI观察MSCs在大鼠肝脏内积累的时间进程,最后进行大鼠肝脏组织切片的原位免疫组织化学染色。**结果** MSCs移植后的第5、9、10天检测的大鼠血浆天冬氨酸转氨酶和丙氨酸转氨酶水平较对照组显著降低($P < 0.05$)。MSCs移植后第1天,大鼠肝脏区域的生物发光强度显著增强,T2*WI标准化信号强度明显减低,于移植后第10天才逐渐恢复到移植前水平。并且随着大鼠肝脏生物发光强度的逐渐下降,荧光素酶阳性的MSCs数目亦随时间进程逐渐减少。**结论** 移植MSCs对大鼠损伤肝脏的功能具有良好的修复作用;且将BLI和MRI相结合可实时、无创示踪移植入大鼠损伤肝脏内的MSCs。

[基金项目] 广东省自然科学基金自由申请项目(2018A0303130050)。

[第一作者] 胡越(1994—),男,安徽滁州人,在读硕士。研究方向:分子影像学。E-mail: 564645462@qq.com

[通信作者] 吴春,中山大学附属第三医院介入科 介入放射学研究所,510630。E-mail: wuch26@mail.sysu.edu.cn

[收稿日期] 2019-03-18 **[修回日期]** 2019-09-11

[关键词] 肝;大鼠;间充质干细胞;生物发光;磁共振成像

[中图分类号] R-332; R445.2 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2019)11-1622-05

急、慢性肝功能损伤可由多种因素引起,严重威胁人类的健康,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植是具有巨大潜力的新治疗策略^[1-2]。相关研究^[3-4]表明干细胞自我更新及多向分化的特性有助于肝损伤的修复和再生。但关于干细胞活体示踪技术鲜见报道。为了将干细胞移植更好地应用于临床,研制实时、无创的干细胞示踪成像技术非常重要。本课题组在之前相关研究^[5]的基础上将标记荧光素酶和 SPION 的 MSCs 移植入急性肝损伤大鼠体内,采用生成像(bioluminescence imaging, BLI)联合 MRI 对移植 MSCs 在大鼠肝脏内的动态改变进行多模态示踪,探讨移植 MSCs 对大鼠急性肝损伤的修复功能。

1 材料与方法

1.1 动物模型 选取雌性 SD 大鼠 90 只,体质量 350~400 g。由中山大学动物中心提供,批号为 SYXK(粤)2012-0081,并通过中山大学实验动物伦理委员会许可。

1.2 仪器与材料 采用 GE 1.5T MR 扫描仪,活体成像系统由 Caliper Life Science 提供。聚乙二醇-聚天冬氨酸(聚乙烯亚胺)-超顺磁性氧化铁纳米颗粒载体(PAI/SPION)^[4]由中山大学化工学院提供;质粒 pDNA(pCMV-Luciferase2-mKate2)由中山大学附属第三医院分子影像实验室提供;低糖 DMEM 培养基及胎牛血清由 Gibco 公司提供。标记荧光素酶和 SPION 的大鼠骨髓 MSCs^[5]由中山大学附属第三医院分子影像学实验室提供。

1.3 急性肝损伤大鼠模型的制备及 MSCs 移植 将在橄榄油中稀释的四氯化碳溶液 0.5 ml/kg 体质量注入 90 只大鼠腹腔建立大鼠急性肝损伤模型。建模 24 h 后,经腹腔注射 10% 水合氯醛溶液(5 μ l/g)进行麻醉,无菌条件下经腹部切口分离出肠系膜上静脉。取 50 只大鼠作为实验组,经肠系膜上静脉将 1 ml 标记荧光素酶和 SPION 的 MSCs 悬液(2×10^6 /ml)缓慢移植入大鼠体内;余 40 只作为对照组,经肠系膜上静脉注射 PBS 溶液。在术后 1、5、9、10 天分别从实验组和对照组各取 10 只大鼠(共 80 只)将其脱颈处死,检测血浆中天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)和丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)水平,并进行肝组织切片 HE

染色及免疫组织化学染色。对剩余 10 只实验组大鼠行体内生物发光成像和 MRI。

1.4 体内生物发光成像 ①将荧光素酶底物(300 mg/kg 体质量)经腹腔注射入大鼠体内;②吸入异氟烷气体麻醉大鼠,利用活体成像系统观察 MSCs 移植前及移植后不同时间点(1、5、9、10 天)体内 MSCs 的生物发光成像并实时记录图片,定量分析肝区 MSCs 的生物发光强度,以 photos/sec/cm²/steradian(sr) 为生物发光强度单位。

1.5 体内 MRI 经腹腔内注射 10% 水合氯醛(5 μ l/g) 溶液麻醉大鼠。对 MSCs 移植前及移植后 1、5、9、10 天行大鼠肝脏 T2* WI。参数:翻转角 20°, TR 450 ms, TE 15 ms, FOV 80 mm, 矩阵 320 \times 192, 层厚 2.0 mm。ROI 设置为 300 mm², 测量大鼠肝脏 T2WI 信号强度,计算标准化信号强度比值。标准化信号强度比值=MSCs 移植后大鼠肝脏 MR 信号强度/MSCs 移植前大鼠肝脏 MR 信号强度。

1.6 免疫组织化学评估 ①大鼠经脱颈处死后切取肝脏,在 4% 多聚甲醛溶液中固定,随后被石蜡包埋,经切片机制片后置入烘烤箱烤片 1 h。②将肝脏组织切片浸入二甲苯溶液 3 次;然后分别浸入不同浓度乙醇溶液。③PBS 溶液清洗后,将切片置入柠檬酸盐缓冲液,微波炉加热后取出室温下自然冷却;滴加 1% Triton 溶液于肿瘤组织切片,再将切片置入过氧化氢酶阻断剂中浸泡。④PBS 溶液清洗后,滴加正常山羊血清封闭液,再滴加兔多克隆抗荧光素酶抗体(由英国 Abcam 公司提供),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。⑤PBS 溶液清洗后,滴加偶联 HRP 的山羊抗兔抗体,用二氨基联苯胺染色,然后依次将切片置入苏木素溶液、不同浓度乙醇溶液和二甲苯溶液。树脂盖玻片封片,光学显微镜下观察并实时拍照。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计分析软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本 *t* 检验比较实验组与对照组大鼠不同时间 AST、ALT 水平差异;以配对 *t* 检验比较 MSCs 移植前与移植后不同时间大鼠肝脏生物发光强度以及标准化 MR 信号强度差异。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 对肝功能损伤的作用 实验组大鼠血浆和 AST/ALT 水平随时间延长而下降。实验组第 5、9、10 天

血浆 AST 和 ALT 水平均低于同一时间点对照组 (P 均 < 0.05 , 表 1)。实验组大鼠的肝脏组织切片呈淡染区的范围(即损伤肝细胞)较对照组显著减少(图 1)。

2.2 活体生物发光成像

MSCs 移植前以及移植后第 1、5、9、10 天的活体生物发光强度逐渐下降。MSCs 移植后第 1 天大鼠肝脏区域的生物发光强度较移植前显著增强,然后随时间进程逐渐下降, MSCs 移植后第 10 天,大鼠肝脏区域的生物发光强度几乎检测不到(表 2)。病理示肝脏区域的红色范围也随着时间进程逐步缩小(图 2)。

2.3 MRI 示踪结果 MSCs 移植后第 1 天,大鼠标准化 MR 信号强度显著下降,此时大鼠肝脏于 $T2^*WI$ 呈显著的阴性成像效果(即变暗征象),直至移植后第 10 天,才逐渐恢复到移植前水平(表 2、图 3)。

2.4 免疫组化结果 肝脏组织切片中,细胞核呈蓝色,褐色表征在 MSCs 内表达的荧光素酶。荧光素酶阳性的 MSCs 主要分布在门静脉周围的血窦内。MSCs 移植后,随着大鼠肝脏生物发光强度的逐渐下降,荧光素酶阳性的 MSCs 数目亦随时间进程逐渐减少。MSCs 移植后第 10 天,在肝脏组织切片中基本观

察不到褐色的荧光素酶阳性间充质干细胞(图 4)。

3 讨论

高效、无创活体成像示踪技术的研制对 MSCs 移植治疗的发展不可或缺。本课题组在之前相关研究^[4]的基础上成功证实了移植的 MSCs 对大鼠损伤肝脏具有良好的功能修复作用;并成功地将生物发光成像和

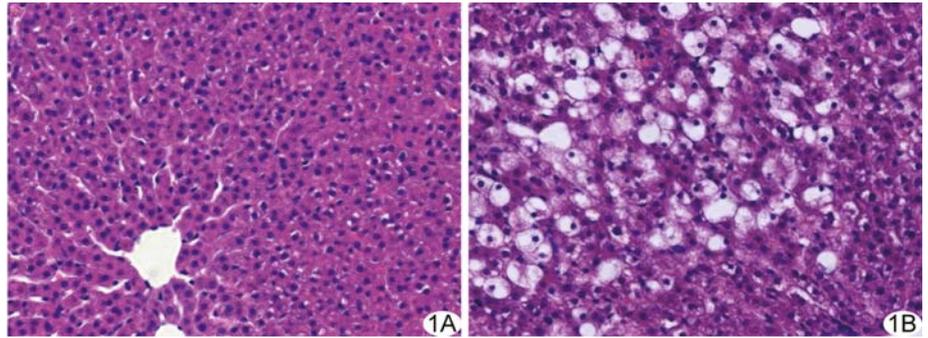


图 1 MSCs 对肝损伤的作用 经肠系膜上静脉注射 MSCs(A)或 PBS 溶液(B)10 天后大鼠肝脏组织的变化(HE, $\times 200$)

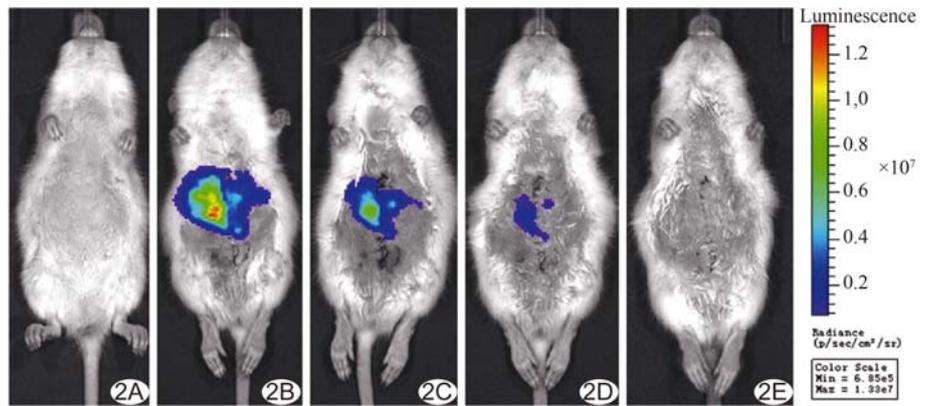


图 2 活体生物发光成像 MSCs 移植前后,急性肝损伤大鼠活体生物发光成像图

表 1 2 组大鼠不同时间 AST、ALT 水平比较(IU/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	AST				ALT			
	1 天	5 天	9 天	10 天	1 天	5 天	9 天	10 天
MSCs 组	590.70 \pm 4.74	352.03 \pm 4.08	255.25 \pm 6.27	223.69 \pm 1.71	275.35 \pm 6.10	220.11 \pm 7.72	98.50 \pm 4.79	47.38 \pm 2.02
对照组	595.17 \pm 4.07	525.44 \pm 3.69	505.50 \pm 5.84	416.12 \pm 2.53	289.54 \pm 7.14	275.23 \pm 8.50	259.26 \pm 4.11	275.01 \pm 7.01
t 值	-0.44	-2.74	-3.27	-3.16	-0.82	-2.30	-3.30	-3.44
P 值	0.67	< 0.05	< 0.01	< 0.05	0.43	< 0.05	< 0.01	< 0.01



图 3 MSCs 体内 MRI 示踪 MSCs 移植前后大鼠肝脏的 $T2^*WI$ A~E. 依次为 MSCs 移植前和移植后 1、5、9、10 天

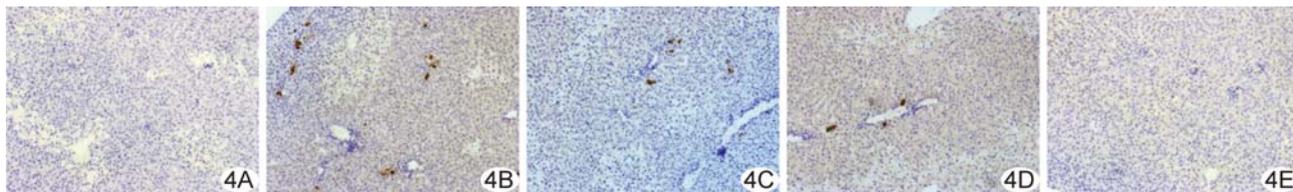


图 4 MSCs 移植后大鼠肝脏组织切片的原位免疫组织化学染色 A~E. 依次为 MSCs 移植前和移植后 1、5、9、10 天, 褐色表征 MSCs 内表达的荧光素酶(×100)

表 2 MSCs 移植前与移植后不同时间大鼠肝脏生物发光强度、标准化 MR 信号强度比较

时间点	生物发光强度比较 (×10 ⁷ /sec/cm ² /sr)	标准化 MR 信号强度比较 (%)
移植前	1.02±0.57	100
移植后 1 天	905.24±3.77*	35.24±3.20*
5 天	497.52±3.91*	53.68±3.83*
9 天	2.80±1.28*	81.10±3.79*
10 天	1.49±3.40	97.19±4.28

注: * : 与移植前比较, P<0.05

MRI 结合, 对移植入大鼠损伤肝脏内的 MSCs 进行了实时、无创的多模态示踪。

本研究成功构建了急性肝损伤大鼠模型。考虑到经门静脉注射可将更多的 MSCs 移植入大鼠肝脏^[6], 肠系膜上静脉的血流主要汇入门静脉, 并且肠系膜上静脉注射相对门静脉注射更容易操作。因此, 本研究将标记了荧光素酶和 SPION 的 MSCs 经肠系膜上静脉注射移植入急性肝损伤大鼠体内。

标记了荧光素酶和 SPION 的 MSCs 经肠系膜上静脉注射移植入大鼠损伤肝脏后, 大鼠血浆 AST 和 ALT 水平呈时间依赖性显著下降, 表明 MSCs 具有修复和抑制急性肝损伤的功能, 其中的机制可能是 MSCs 在凋亡过程中释放膜微粒, 后者介导的信号传递可用于修复损伤肝组织^[7], 亦或是抑制成纤维细胞的增殖与 α-平滑肌肌动蛋白的表达, 加快基质金属蛋白酶的分泌^[8]等。

如活体生物发光成像所示, 移植入大鼠损伤肝脏的 MSCs 表达丰富的荧光素酶, 作用于荧光素酶底物产生大量光子, 活体成像系统可长期监控 MSCs 在大鼠损伤肝脏内的定植情况。MSCs 移植后, 大鼠肝脏生物发光强度随时间进程逐渐下降, 在移植后第 10 天基本上检测不到。生物发光强度与细胞活性密切相关, 因为产生光子的酶促反应只能在活细胞中进行。大鼠肝脏生物发光强度的下降或许是由于 MSCs 迁出肝脏、局部缺血缺氧导致间充质干细胞死亡^[9]、免疫排斥反应^[10-11]、很难逃逸肝窦内皮细胞对 MSCs 的杀

伤^[12]等。

当标记了荧光素酶和 SPION 的 MSCs 经肠系膜上静脉注射移植入急性肝损伤大鼠体内后, 经 MRI 观察到 MSCs 广泛分布在大鼠损伤肝脏内, 于 MR T2* WI 呈现出显著的低信号强度。连续的 MRI 观察结果表明定植在大鼠损伤肝脏的 MSCs 可经 MR T2* WI 成功示踪, 时程长达 9 天, 这与我们之前的研究报道基本一致^[13]。肝脏组织切片的原位免疫组织化学染色确认了标记荧光素酶和 SPION 的 MSCs 主要分布在门静脉周围及损伤的肝细胞区域, 并且干细胞数目随时间进程逐渐减少。

本研究结果显示 MSCs 移植后, MRI 示踪定植在肝脏 MSCs 的时程较生物发光成像略长。产生这个现象的潜在原因或许是在生物发光成像中, 残存的活细胞经酶促反应产生的光子穿过机体深层组织发生能量衰减和散射后, 光子强度不足以被活体成像系统检测到, 而 MR 可断层成像, 具有不受限制的组织穿透能力, 正好弥补了生物发光成像受组织深度影响的缺陷。同时, 肝脏组织切片的原位免疫组织化学染色也证实了 MSCs 移植后第 11 天, 确实有极少数 MSCs 存在肝脏内。当 SPION 从移植的 MSCs 内排出后, SPION 会被体内网状内皮系统选择性吸收并参与体内血红蛋白的代谢过程^[14]。

本研究结果显示 MSCs 移植后, BLI 和 MRI 的联合成像成功对移植 MSCs 在大鼠肝脏内的动态改变进行了多模态示踪。BLI 具有无辐射、高敏感度和能够追踪移植后活体细胞生存状态的优点, 但是空间分辨率较差, MR 扫描可断层成像, 具有不受限制的组织穿透能力, 正好弥补了 BLI 受组织深度影响的缺陷, 但是对移植后活体细胞生存状态的判断能力差, 两者相互弥补, 可以达到更好的体内活体细胞的示踪效果。

总之, 本研究证实了 MSCs 具有修复和抑制急性肝损伤的作用, 并成功的将 BLI 和 MRI 相结合, 对移植入大鼠损伤肝脏内的 MSCs 进行了实时、无创的示踪, 在以 MSCs 为基础的临床治疗及再生医学领域有

巨大的应用潜力。

[参考文献]

[1] Abbasi-Malati Z, Roushandeh AM, Kuwahara Y, et al. Mesenchymal stem cells on horizon: A new arsenal of therapeutic agents. *Stem Cell Rev*, 2018, 14(4):484-499.

[2] Jang YO, Kim YJ, Baik SK, et al. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic: A pilot study. *Liver Int*, 2014, 34(1):33-41.

[3] Zou ZL, Cai YJ, Chen Y, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury and regulate the expression of fibrinogen-like-protein 1 and signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2):2089-2097.

[4] Zhang GZ, Sun HC, Zheng LB, et al. In vivo hepatic differentiation potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Therapeutic effect on liver fibrosis/cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 2017 23(3):8152-8168.

[5] 吴春, 姜在波, 朱康顺, 等. 间充质干细胞多模态示踪方法的应用. *中国医学影像技术*, 2017, 33(2):171-176.

[6] Bos C, Delmas Y, Desmoulière A, et al. In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. *Radiology*, 2004, 233(3):781-789

[7] Tomasoni S, Longaretti L, Rota C, et al. Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(5):772-780.

[8] Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, et al. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett*, 2007, 581(21):3961-3966.

[9] Ju S, Teng GJ, Lu H, et al. In vivo differentiation of magnetically labeled mesenchymal stem cells into hepatocytes for cell therapy to repair damaged liver. *Invest Radiol*, 2010, 45(10):625-633

[10] Oliveira RL, Chagastelles PC, Sesterheim P, et al. In vivo immunogenic response to allogeneic mesenchymal stem cells and the role of preactivated mesenchymal stem cells cotransplanted with allogeneic islets. *Stem Cells International*, 2017, 2017:1 - 12.

[11] Zhao K, Lou R, Huang F, et al. Immunomodulation effects of mesenchymal stromal cells on acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(1):97-104.

[12] Malhi H, Annamaneni P, Slehria S, et al. Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver. *Hepatology*, 2002, 36(1):112-121

[13] Zhou B, Shan H, Li D, et al. MR tracking of magnetically labeled mesenchymal stem cells in rats with liver fibrosis. *Magn Reson Imaging*, 2010, 28(3):394-399.

[14] Wang Y, Hussain S, Krestin G. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: Physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol*, 2001, 11(11):2319-2331.

消 息

《中国医学影像技术》作者投稿请登录本刊网站(www. cjmit. com)主页, 点击左上角“作者登录”进入, 第一次投稿需完成作者注册; 专家审稿请点击“审稿登录”进入。

为了便于广大作者、读者查阅本刊文献, 本站提供从 1985 年创刊起所有期刊的全文检索。