

超声辐照联合微泡增强介导 SPIO 标记 ADSCs 及细胞内铁蛋白表达^{*}

王 瑛¹, 叶素敏¹, 陈绮璐¹, 张晓云¹, 黄帼英¹, 刘再毅^{2* * *}

(1. 广州医学院第一附属医院 超声科, 广东 广州 510120; 2. 广东省人民医院广东省医学科学院 放射科, 广东 广州 510080)

[摘 要] 目的: 探讨超声辐照联合微泡增强介导超顺磁氧化铁(SPIO)标记脂肪干细胞(ADSCs), 及其对干细胞内铁蛋白表达的影响。方法: 使用超声辐照干细胞 + 超声微泡 + SPIO 细胞悬液标记 ADSCs, 使用普鲁士蓝染色检测细胞的 SPIO 标记情况, 台盼兰染色检测细胞活力, 并使用 Western-blot 对 ADSCs 内的铁蛋白轻链(Fn-L)表达进行检测。结果: 普鲁士蓝染色可见 ADSCs 铁染色呈阳性, 在胞浆内可见蓝色颗粒; 台盼兰染色检测细胞活力实验组与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$), 标记后的 ADSCs 内的 Fn-L 表达在标记后 2 h 即升高。结论: 超声辐照联合微泡增强可以有效对 ADSCs 进行磁探针标记, 标记后细胞内铁蛋白升高。

[关键词] 干细胞; 超顺磁氧化铁; 超声微泡; 铁蛋白

[中图分类号] R445.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)02-0141-04

Enhancement of Ultrasonic Exposure Associated with Microbubble Mediation to ADSCs Labeling by SPIO and Its Effect on Intracellular Ferritin Expression

WANG Ying¹, YE Sumin¹, CHEN Qilu¹, ZHANG Xiaoyun¹, HUANG Guoying¹, LIU Zaiyi²

(1. Department of Ultrasonics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, Guangdong, China; 2. Department of Radiology, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the feasibility of labeling adipose-derived stem cells (ADSCs) with superparamagnetic iron oxide (SPIO) mediated by ultrasonic exposure associated with microbubbles and its effect on intracellular ferritin light chain (Fn-L) expression. **Methods:** ADSCs were labeled with SPIO particles mediated by ultrasonic exposure and microbubbles. The labeling effect was evaluated by prussian blue staining, and viability of the labeled cells was assessed by trypan blue staining. Intracellular Fn-L level was examined by western blot. **Results:** Prussian blue staining demonstrated that iron staining was positive in ADSCs and blue particles located in the cytoplasm of the ADSCs. Trypan blue test showed that there was no statistical difference ($P > 0.05$) in viability between labeled and unlabeled groups. The intracellular Fn-L level increased in 2 hours after labeling. **Conclusions:** Ultrasound exposure combined with microbubble enhancement is effective in stem cell SPIO labeling, and in maintaining intracellular iron homeostasis by increasing intracellular Fn-L expression.

[Key words] stem cell; supraparamagnetic iron oxide; ultrasound microbubbles; ferritin

研究表明干细胞移植在修复脑梗死、心肌梗死及其他组织损伤中具有非常诱人的临床应用前

景^[1-2]。但如何活体示踪移植细胞在体内的归巢、移行、空间分布及细胞分化,一直是研究者所关注

* [基金项目] 广东省医学科学技术研究基金(A2011036), 广州医学院青年基金(2010A07)。

* * 通信作者 E-mail: liuiy527@163.com; E-mail: zyliu@163.com

的重点。研究表明,超顺磁氧化铁(supraparamagnetic iron oxide, SPIO)纳米微粒标记干细胞磁共振成像(MRI)是最具有前景的方法之一^[3-5],但未经表面修饰的 SPIO 颗粒很难标记干细胞。研究者通常使用转染剂接到 SPIO 标记干细胞,但高浓度的转染剂对细胞有毒性^[6],因此如果能开发一种无需转染剂即可有效标记干细胞的方法,则可避免细胞毒性的问题^[5]。体内外实验证实超声辐照联合微泡增强可以有效转染质粒 DNA 或者药物进入细胞,具有极高的安全性^[7-9]。本研究假设也可以用超声联合微泡增强来进行干细胞 SPIO 标记,希望能提供一种不需转染剂介导而进行的干细胞 SPIO 标记的方法。由于 SPIO 标记细胞时,细胞内引入大量的铁,而细胞内铁过载将损害细胞^[10]。文献报道细胞内铁超载时,铁蛋白将随之变化以保持细胞内铁稳态的维持^[11-12],但文献未对就 SPIO 标记干细胞后细胞内铁蛋白的变化的进行研究,因此本研究还研究 SPIO 标记对细胞内铁蛋白的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 主要材料:声诺维 SonoVueTM (Bracco SpA, 意大利),铁羧葡氨(Resovist 先灵,德国),台盼兰(Sigma 公司,美国),普鲁士蓝染色剂及核固红(Sigma 公司,美国),铁蛋白抗体(Abcam 公司,美国),超声波辐照仪(Sonic15C, FYSIOMED 公司,比利时)。

1.2 细胞培养 将大鼠脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs, 广东省人民医院颜丽芬医生惠赠)接种于 75 mL 培养瓶内,使用 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和低糖培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养,置培养瓶于 5% CO₂、37 °C 孵箱内,每周 2 次换液,倒置显微镜观察细胞生长情况,细胞铺满瓶底 > 90% 时,0.25% 胰蛋白酶消化细胞,1:2 比例传代培养。

1.3 超声辐照增强介导 SPIO 标记干细胞 (1)微泡制备:将生理盐水 5 mL 加入到装有超声微泡粉末的瓶中,剧烈晃动数秒即可制备出直径小于 6 μm 的微泡。(2)干细胞磁探针标记:0.25% 胰蛋白酶消化细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,使用无血清 DMEM 重悬细胞,调整细胞浓度为 $(1 \sim 2) \times 10^6$ /mL,将细胞悬液移入 6 孔板(800 μL/孔),加入微泡 200 μL,再加入 SPIO

(200 μg/mL);设置加 SPIO、未加微泡有超声辐照增强组为对照组。(3)体外超声辐照增强方法:探头置于 6 孔板下方,探头与六孔板底之间覆以超声耦合剂。声束方向朝上,频率 3 MHz,输出功率 1.0 W/cm²,占空比 50%,照射时间 60 s。照射完毕,添加少许血清于细胞悬液内,将 6 孔板置 5% CO₂、37 °C 孵箱内孵育 10 min, PBS 洗涤细胞 3 次以除去液体中多余 SPIO 待用。各组均设 3 个复孔。

1.4 干细胞 SPIO 标记普鲁士蓝染色 取部分标记细胞直接涂片,室温下风干细胞涂片,然后甲醇固定 10 min;取部分细胞用完全培养基重悬铺于 6 孔板内经多聚赖氨酸处理后的玻片(24 mm × 24 mm)上,2 h 后细胞贴壁,弃培养液, PBS 冲洗 3 次,甲醇固定 10 min 后取出载玻片后风干。染色方法:3% 亚铁氢化钾 + 2% HCl 37 °C 孵育 30 min,蒸馏水冲洗,核固红复染 10 min, PBS 冲洗,光镜观察细胞 SPIO 标记率。

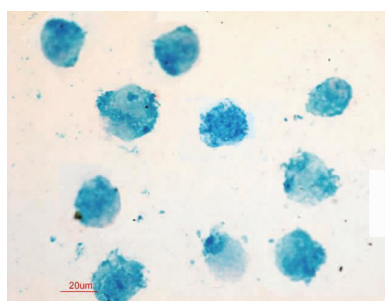
1.5 细胞活力检测 取标记后的细胞再培养 2 h 后,0.25% 胰蛋白酶消化细胞,台盼兰实验检测细胞活力(取细胞悬液 50 μL/孔 + 0.2% 台盼蓝 50 μL 染色检测细胞活力)。设置未标记细胞组为对照组。

1.6 细胞内铁蛋白表达检测 细胞标记后,重新置入培养瓶培养,分别在标记后 2、4、8、12、16、20、24 h 提取细胞内蛋白,使用 Western-blot 法检测细胞内铁蛋白的表达。取收集的蛋白 30 μg,加入 SDS-PAGE 胶加样孔,65 V,30 min 后样品被浓缩进入分离胶,将电压改为 100 V、60 min 后取出电泳胶。除去浓缩胶,将分离胶浸泡于电转缓冲液中 10 min,浸泡滤纸,海绵垫于电转缓冲液 15 ~ 30 min,浸泡 PVDF 膜于甲醇中 1 ~ 2 min 然后放入电泳缓冲液中,电泳 15 V,120 min,5% 脱脂奶粉封闭,加一抗后 4 °C 振荡过夜。洗涤后加二抗(羊抗鼠 IgG-HRP 或 鼠抗羊 IgG-HRP),4 °C 摇床过夜。用 ECL 发光法显示目的条带,于暗房中曝光 10 ~ 30 s, Kodak 冲片机定影,显影。将所得胶片用数码相机摄像, Molecular Analysis 图象分析软件进行分析。

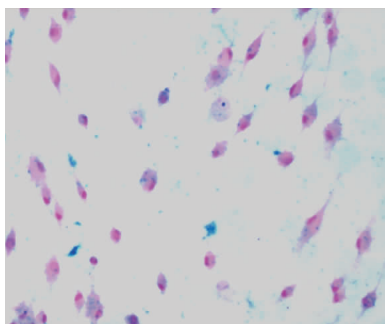
1.7 统计学方法 使用 SPSS 13.0 进行样本统计。阴性对照组和试验组细胞活力及蛋白表达差别比较采用 *t* 检验或方差分析, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞内铁普鲁士蓝染色定性分析 超声辐照后立即涂片、固定后普鲁士兰染色见近 100% 的细胞染色阳性,细胞胞表明覆盖有蓝色铁颗粒(图 1);标记后培养 2 h 后再行普鲁士蓝染色,细胞贴壁,胞浆内可见较多蓝色铁颗粒,较立即涂片固定染色观察显示更为清楚(图 1)。而对照组(加有 SPIO,未加微泡,但行超声辐照组,细胞铁标记率低,只有少数细胞内可见微量蓝色颗粒(图 2)。



标记后立即涂片($\times 400$)



标记后培养 2 h 涂片($\times 200$)

图 1 ADSCs 超声辐照进行 SPIO 标记(普鲁士蓝)

Fig.1 ADSCs labeled by SPIO under ultrasonic exposure

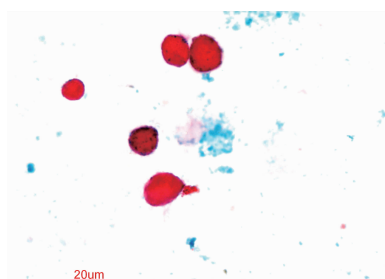


图 2 无微泡,只有 SPIO + 超声辐照
(普鲁士蓝, $\times 400$)

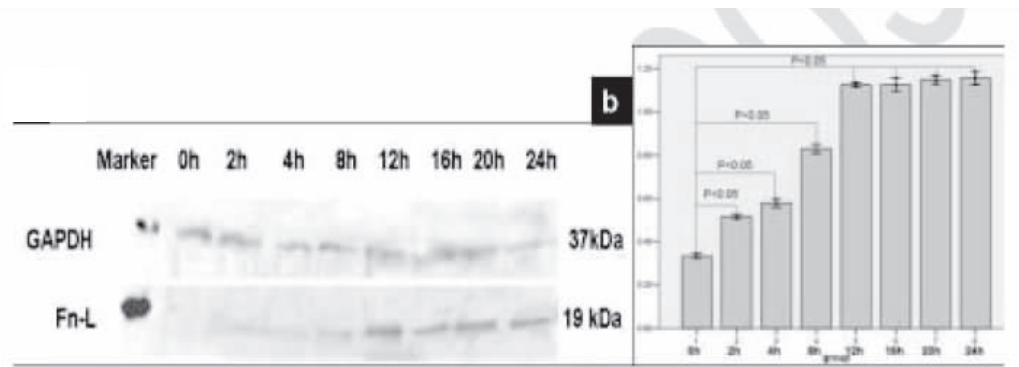
Fig.2 Prussian blue staining of ADSCs after
SPIO labeling through ultrasonic
exposure without microbubble

2.2 细胞活力检查 台盼蓝实验显示标记组(92.2%)和未标记组(93.1%)的活力,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 标记细胞内铁蛋白的表达 SPIO 标记开始后,干细胞内的铁蛋白轻链(Fn-L)的蛋白表达从 2 h 开始上调,此后逐渐增加,在 12 h 标记结束时达到高峰($P < 0.05$),16 h、20 h、24 h 后无明显变化($P > 0.05$)。见图 3。

3 讨论

本研究发现超声辐照增强可以在无需任何转染剂存在的情况下,可高效、安全地对 ADSCs 进行 SPIO 标记,标记率近 100%。普鲁士兰染色发现所有细胞的胞浆内都有蓝色铁颗粒存在,但较为分散,而细胞核却未见明显的铁颗粒摄取。在微泡存在的情况,超声微泡破裂可以在细胞膜上产生约 100 nm 大小的可复性微空,这也是超声微泡增强转染基因的基础^[8-9, 13]。在本研究中使用的 SPIO 是 Ferucarbotran,其核心颗粒大小约 3 ~ 5 nm,包被羧基右旋糖苷后平均大小为 62 nm。因此,在进行超声辐照增强标记 SPIO 时,SPIO 或许可以直接通过 100 nm 的小孔直接进入细胞内,然后被内涵体/溶酶体吞噬。本研究预试验发现在没有超声微泡的情况下,干细胞的 SPIO 标记效率极低,而在使用微泡后标记率近 100%。但仅靠可复性空洞的形成促使 SPIO 内流是否可以促使单个细胞标记到足够的 SPIO,认为可能还存在其他的机制。正常情况下,SPIO 与细胞膜均带负电荷,因此 SPIO 很难为细胞所吞噬。如果可以使 SPIO 有效黏附到细胞膜表面,就能够有助于细胞吞噬 SPIO 颗粒。有研究者使用电穿孔法(超声辐照增强同样属于物理方式,利用电流的效应而无需转染剂介导)进行细胞 SPIO 标记,认为其可以有效标记细胞的原理可能是促使 SPIO 黏附到细胞膜表面从而促进内吞有关,而不是直接在细胞膜上产生小孔促使 SPIO 内流^[5]。在本试验中,在超声辐照增强下,空化效应的多种物理效应,比单一的电穿孔电流的效应更复杂多样,可以有效使得 SPIO 克服其与细胞膜间的阻力黏附在细胞膜表面,促使细胞将 SPIO 吞入细胞内,从而标记细胞。因此,推测超声辐照增强进行干细胞的 SPIO 的标记的原理主要与空化效应直接在细胞膜上打孔和促使 SPIO 黏附到细胞膜表面有关,但具体的机理还需要进一步研究。



a. western-blot 图

b. 为定量分析柱形图

图3 SPIO 标记后细胞内铁蛋白轻链蛋白质表达

Fig. 3 Intracellular Fn-L expression after SPIO labeling

铁元素为细胞生长增殖及机能活动维持所必需的微量元素之一,在细胞的 DNA 合成、电子传递以及氧气运输等过程中发挥重要作用,但铁超载潜在诱导氧自由基生成,导致细胞的损伤^[10]。SPIO 标记干细胞时,细胞内的铁浓度较正常增加数十至百倍^[3-5],而细胞内铁稳态的维持极其重要。研究发现,细胞内铁超载时,细胞内铁蛋白合成增加,整合细胞内多余的游离铁以保护细胞。铁蛋白分为铁蛋白重链(Fn-H)和和轻链(Fn-L),前者主要高表达于心脏,后者主要高表达于肝脏及其他组织^[10]。本研究中,发现主要研究干细胞的 Fn-L 的蛋白表达从第 2 h 开始上调,此后逐渐增加,在 12 h 标记结束时达到高峰,16、20、24 h 后无明显变化,表明 SPIO 标记后,干细胞即表达铁蛋白,以中和细胞内多余的游离铁,保持细胞内铁稳态的维持,从而保护细胞免受游离铁的毒性作用,研究结果和其他研究类似^[11-12]。

本研究结果表明,超声辐照增强可以在无需任何转染剂存在的情况下,能够高效、安全的对干细胞进行 SPIO 磁探针标记,且标记后的干细胞内的铁蛋白表达上升,以整合细胞内多余的游离铁,从而保护细胞。

4 参考文献

- [1] Monti M, Perotti C, Del Fante C, et al. Stem cells: sources and therapies [J]. *Biological Research*, 2012 (45):207-214.
- [2] Malliaras K, Zhang Y, Seinfeld J, et al. Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart[J]. *EMBO Mol Med*, 2012(2):191-209.
- [3] Barnett BP, Arepally A, Karmarkar PV, et al. Magnetic resonance-guided, real-time targeted delivery and imaging of magnetocapsules immunoprotecting pancreatic islet cells[J]. *Nature Medicine*, 2007(13):986-991.
- [4] Politi LS. MR-based imaging of neural stem cells [J]. *Neuroradiology*, 2007(6):523-534.
- [5] Walczak P, Ruiz-Cabello J, Kedziorek DA, et al. Magneto-electroporation: improved labeling of neural stem cells and leukocytes for cellular magnetic resonance imaging using a single FDA-approved agent [J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2006(2):89-94.
- [6] Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, et al. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis [J]. *NMR in Biomedicine*, 2004(17):513-517.
- [7] Delalande A, Postema M, Mignet N, et al. Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery: recent advances and ongoing challenges [J]. *Therapeutic Delivery*, 2012 (3):1199-1215.
- [8] Taniyama Y, Azuma J, Kunugiza Y, et al. Therapeutic option of plasmid-DNA based gene transfer [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012(12):1630-1637.
- [9] Rudd L, Pichon C, Delalande A. Ultrasound and microbubbles assisted-gene transfer: what is next? [J]. *Ultraschall in Der Medizin*, 2012(33):391-393.
- [10] Lee IL, Li PS, Yu WL, et al. Synthesis and interfacing of biocompatible iron oxide nanoparticles through the ferroxidase activity of Helicobacter Pylori ferritin. *Biofabrication*, 2012(4):045001.
- [11] Wang J, Xie J, Zhou X, Cheng Z, et al. Ferritin enhances SPIO tracking of C6 rat glioma cells by MRI [J]. *Molecular Imaging and Biology: MIB: The official Publication of The Academy of Molecular Imaging*, 2011 (13):87-93.

(下转第 151 页)

化,但 ER 表达的下降将会影响 E2 的生物学效应,进而可能影响到子宫内膜的修复。

P 是由黄体所分泌,在妊娠的维持过程中具有重要作用,P 能够使子宫平滑肌细胞膜电位增加,导致兴奋域值升高,阻碍兴奋在子宫平滑肌的传播,降低子宫的收缩^[8]。本研究发现,在药物流产出血后的第 14 天,异常子宫出血组患者体内 P 水平要高于对照组,提示 P 水平能够抑制子宫收缩,使得蜕膜或绒毛组织不易排出,而引起子宫出血时间延长。

hCG 是由胎盘组织所分泌,并在妊娠过程具有重要作用。Rorbye^[9]报道手术流产后,hCG 在流产后 21 天降至正常水平。本研究中,两组患者体内 hCG 水平逐渐降低,正常组在 22 天时基本接近正常水平,异常出血组中 hCG 水平也降低,但在第 22 天时仍处于较高水平,提示异常子宫出血患者体内可能存在滋养细胞的残留。刘庆^[10]研究了药物流产后异常子宫出血患者,发现宫腔诊刮的病理组织中有绒毛或蜕膜组织残留。

综上所述,药物流产后异常子宫出血患者血清 P 和 hCG 水平异常,监测和恢复血清 P 和 hCG 水平,对预测和治疗具有一定意义。

4 参考文献

[1] 吕琼莹,张蔚,程静,等. 手术流产与药物流产的临床结果比较的 Meta 分析[J]. 中华临床医师杂志, 2012(14):3996-4001.

[2] Bouchard P, Chabbert - Buffet N, Fauser BC. Selective progesterone receptor modulators in reproductive medicine: pharmacology, clinical efficacy and safety[J]. Fertil Steril, 2011(5):1175-1189.

[3] Spitz IM. Mifepristone: where do we come from and where are we going? Clinical development over a quarter of a century[J]. Contraception, 2010(5):442-452.

[4] 傅晓敏,王雯,黄丽丽. 药物流产后异常子宫出血者子宫内膜中血管生成素 1、2 的表达[J]. 解剖学报, 2007(6):751-754.

[5] Pregnancy termination with mifepristone and gemeprost: a multicenter comparison between repeated doses and a single dose of mifepristone. World Health Organization[J]. Fertil Steril, 1991(1):32-40.

[6] 程雪梅. 米非司酮对子宫肌瘤雌、孕激素水平及受体表达的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2012(4):419-420.

[7] 吴小容. 大剂量米非司酮对绝经后子宫内膜息肉的雌、孕激素受体及 Ki-67、Bcl-2 的影响[J]. 中国医药导报, 2008(5):40-41.

[8] 郭春明,孙刚. 哺乳类动物妊娠晚期孕激素撤退的三种机制[J]. 生理学报, 2010(2):171-178.

[9] Rorbye C, Norgaard M, Nilas L, et al. Prediction of late failure after medical abortion from serial beta-hCG measurements and ultrasonography [J]. Hum Reprod, 2004(1):85-89.

[10] 刘庆. 药流后阴道出血宫腔刮出物的病理观察[J]. 中国妇幼保健, 2013(3):575-576.

(2012-12-25 收稿,2013-02-27 修回)

编辑:周 凌

(上接第 144 页)

[12] Lopez-Castro JD, Maraloiu AV, Delgado JJ, et al. From synthetic to natural nanoparticles: monitoring the biodegradation of SPIO (P904) into ferritin by electron microscopy[J]. Nanoscale, 2011(3):4597-4599.

[13] Yang SJ, Chang SM, Tsai KC, et al. Enhancement of chitosan nanoparticle-facilitated gene transfection by

ultrasound both in vitro and in vivo. Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials, 2012(100B):1746-1754.

(2013-02-19 收稿)

编辑:文箴颖