

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000425

磁共振示踪小鼠树突状细胞归巢淋巴结的初步研究

肖玲¹, 吴昌强², 余国荣³, 陈建容³, 徐晔³

(1. 重庆医科大学附属儿童医院检验科, 重庆 400014; 2. 四川大学国家生物医学材料研究中心, 成都 610064;

3. 重庆医科大学附属儿童医院放射科, 重庆 400014)

【摘要】目的: 尝试采用磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)监测磁标记树突状细胞(dendritic cell, DC)归巢引流淋巴结。方法: DC由小鼠骨髓细胞经诱导分化获得。探针为烷基化低分子量聚乙烯亚胺(PEI2k)包裹的超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)纳米颗粒, 标记方法为成熟DC与探针共孵育过夜。收集细胞, 行标记效果、细胞分子表型分析。将标记的成熟DC注入小鼠足底, 行不同时间点MRI, 观察DC归巢淋巴结, 72 h后, 取腘窝淋巴结送病理检查。结果: DC纯度高达90%。普鲁士兰染色和激光共聚焦成像显示探针位于细胞内。流式细胞术(fluorescence activated cell sorting, FACS)分析表明, 标记过程对DC的成熟表型无明显影响。体内MRI和淋巴结病理显示, 24 h后标记DC在淋巴结内聚集。结论: 采用N-alkyl-PEI2k/SPIO纳米探针标记DC后, MRI可以清楚地监测其在体内归巢淋巴结的情况。

【关键词】超顺磁性氧化铁纳米颗粒; 磁共振成像; 细胞示踪

【中图分类号】R445.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-06-23

A pilot study on *in vivo* MRI tracking of magnetically labeled dendritic cells homing to the draining lymph nodes

Xiao Ling¹, Wu Changqiang², Yu Guorong³, Chen Jianrong³, Xu Ye³

(1. Department of Clinical Laboratory, the Children's Hospital, Chongqing Medical University;

2. National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University;

3. Department of Radiology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To track homing of magnetically-laden dendritic cells(DCs) into the draining lymph nodes using magnetic resonance(MR) imaging. **Methods:** Mature DCs generated from murine bone marrow cells were labeled with a laboratorially-synthesized alkylated-polyethyleneimine(PEI2k) coated superparamagnetic ironoxide(SPIO) nanoparticle. Perl's staining, confocal laser scanning microscopy(CLSM), and fluorescence activated cell sorting(FACS) were followed to analyze labeling results and expression of mature phenotype, respectively. For *in vivo* MR imaging, gradient amount of DCs were subcutaneously injected into the footpads of three mice. MR scanning was performed at different time points. At 72 h after injection, mice were sacrificed to extract the popliteal lymph nodes for pathological examination. **Results:** A final purity of about 90% DC was achieved by this culture method. Probes located in cytoplasm after overnight labeling, as evidenced by Perl's staining and CLSM. Labeling process did not impact obviously on the maturation phenotypes of DCs. Both MRI and pathological studies documented the successful migration of labeled DCs into popliteal nodes. **Conclusion:** It is feasible to utilize MR imaging to track the *in vivo* migration of DCs labeled with N-alkyl-PEI2k/SPIO nanoprobe.

【Key words】superparamagnetic iron oxide nanoparticle; magnetic resonance imaging; cell tracking

树突状细胞(dendritic cells, DC)是体内免疫系统最主要的抗原递呈细胞, 它们通常以未成熟DC

的方式存在于外周组织中, 一旦捕获抗原, 将转化为成熟DC, 迁移到次级淋巴组织的T细胞区, 通过主要组织相容复合体和共刺激分子介导的胞内信号传导, 将处理的抗原分子递呈给邻近的T细胞, 使T细胞激活并大量增殖, 从而获得特异性的免疫反应^[1]。

作者简介: 肖玲, Email: rbc_69@163.com。

研究方向: 细胞形态学及血小板相关疾病的研究。

通信作者: 徐晔, Email: 2581991891@qq.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150918.1248.003.html>

(2014-10-30)

基于 DC 的疫苗(下文简称为 DC 疫苗)已应用于包括恶性肿瘤等多种疾病治疗的临床研究,并取得了令人鼓舞的疗效。然而,治疗效果并不稳定,影响因素较多,有 2 点较为关键:(1)疫苗是否成功迁移到淋巴组织;(2)疫苗是否成功激活抗瘤特异性免疫反应^[2-4]。因此,临床治疗中有必要及时地获取相关信息,指导治疗方案的改进。已有证据表明,影像学技术可用于对上述问题的评价^[2]。与其它成像技术比较,磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)具有无创无辐射,时空分辨率高,成像模式多样化等优点,已被广泛用于兴趣细胞的体内示踪。de vries 等^[4]在 2005 年的 Nature Biotechnology 上报道了一项人体 DC 抗癌疫苗影像示踪的研究,这项研究表明,采用超顺磁性氧化铁纳米颗粒标记 DC 疫苗进行 MRI 检查,可以清楚地显示疫苗的传输效果,其准确性远高于超声导向技术。此后,磁标记 DC 的体内 MRI 研究,在英文文献中开始少量陆续报道。

分子量为 2 kD 的 PEI(PEI2k)系生物安全性良好的有机聚合物分子,经烷基化修饰的 PEI2k 具有水和脂两亲性,基于这一特点自组装包裹超顺磁性氧化铁纳米颗粒(superparamagnetic iron oxide, SPIO)获得的 T2 类 MRI 纳米探针,具有弛豫效率高、易修饰、易标记、低毒性等优点,已被成功地用于多种细胞的标记示踪和基因转染^[5-6]。本研究采用该种探针在体外标记小鼠 DC,将其注入小鼠体内,并在 7 Tesla(T)MR 成像仪下对引流淋巴结进行成像,借以可视性地评价 DC 归巢淋巴结的情况。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物来源 健康雄性 8~12 周龄 Balb/C 鼠 4 只,小鼠购自四川大学实验动物中心。实验动物的处置符合四川大学制定的动物实验伦理学规范。

1.1.2 主要试剂 RPMI1640 培养基、胎牛血清(FBS)购自 Thermo 公司。重组小鼠粒-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)和肿瘤坏死因子(TNF- α)购自 Peprotech 公司,脂多糖(LPS)购自 Hycult biotech 公司,DAPI 核染液购自 Sigma 公司,荧光抗体 PE-anti-mouse CD11c、PE-anti-mouse CD80、PE-anti-mouse CCR7 购自 BD 公司。磁共振探针:烷基化 PEI2k 包裹的氧化铁纳米颗粒,由四川大学吴昌强博士合成。

1.2 方法

1.2.1 纳米探针的制备 按照文献报道的方法^[9],PEI2k(购

自 Alfa Aesar)与溶解于乙醇中的 1-碘十二烷基(购自 Sigma-Aldrich)反应,冻干后获得胶冻状的烷基化 PEI2k。SPIO 的合成参照 Sun 的报道^[9],获得的 SPIO 纳米颗粒用乙醇沉淀,去除正己烷后,用氯仿重新分散,在超声振荡下,按质量比 1:0.6 与烷基化 PEI2k 混合,旋蒸去除残余氯仿,得到水溶性的烷基化 PEI2k 包裹的 SPIO 复合物。

1.2.2 小鼠骨髓源性 DC 的培养和成熟 参照文献[7],脱颈处死 6~8 周龄 Balb/C 鼠,摘下肢骨和胫骨,于 75%酒精中浸泡消毒后,取出晾干。向培养皿中倒入 RPMI1640 培养基,用注射器将骨髓冲出,转入离心管离心 10 min,转速为 1 200 r/min。弃去上清液,加入红细胞裂解液(1 \times ACK)2 ml 裂解 3~5 min,加含 10%胎牛血清的培养基 10 ml,离心后弃去上清液,另加培养基清洗后重悬。计数细胞,将细胞按浓度 2×10^5 /ml 培养基(含 10%胎牛血清、1%双抗)转入培养皿,加 rmGM-CSF (20 ng/ml)。于细胞培养箱中培养 3 d 后,等量加液。第 6 天半量换液。第 8 天收集悬浮细胞,做相应检测。小鼠骨髓源性 DC 的诱导成熟:上述方法培养细胞至第 8 天后,转入新的组织培养皿,加入 LPS 100 ng/ml 和 TNF- α 20 ng/ml,继续培养 1~2 d。

1.2.3 DC 纯度的流式细胞术(flow cytometry, FACS)检测 收集悬浮的未成熟 DC,离心后弃去上清液,加 PBS 洗 2 次,重悬于 20 μ l PBS 中,避光加 2 μ l CD11c 抗体,常温孵育 15~30 min,加 500 μ l PBS,转入流式离心管离心,弃去上清液,加 100 μ l PBS,上机检测。以未加抗体的未成熟 DC 为对照,借以扣除本底荧光噪声的干扰。

1.2.4 DC 的 MRI 纳米探针标记 收集成熟 DC,离心后去上清液,重悬后加入纳米探针共孵育 6 h,探针浓度为 7 μ g Fe/ml。

1.2.5 DC 的标记效果分析

1.2.5.1 普鲁士蓝染色 收集已标记的成熟 DC,离心后去上清液,PBS 洗 2 次,加少许培养基分散细胞,取细胞悬液涂布于载玻片上,样本晾干后,取 20%亚铁氰化钾溶液与浓盐酸混合,滴加于样本上反应 30 min,自来水冲洗,加核固红复染 15 min,水冲洗 1~2 min,晾干后于显微镜下观察摄片。

1.2.5.2 激光共聚焦成像(confocal laser scanning microscopy, CLSM) 将异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)结合到探针表面的羟基上,与 DC 孵育过夜,成熟 2 d。避光收集悬浮细胞,离心后弃去上清液。按体积比 10:1 加入 DAPI 工作液,孵育 15 min,离心后去上清液,加入 PBS 洗 1、2 次,留少许余液分散细胞,涂布于载玻片上,封片送检。

1.2.6 DC 标记的 FACS 检测 细胞培养诱导成熟后标记探针,收集细胞,照 1.2.3 描述方法,准备待测样品,上机分别检测 CD80、CCR7 等 2 个表面分子标志物的表达。

1.2.7 DC 的体内 MR 示踪 Balb/C 鼠 3 只,左侧后肢足底皮下注射 40 μ l 成熟的标记 DC(细胞数为 5×10^6 、 1×10^6);右侧后肢注射 40 μ l 数量相同但未标记探针的成熟 DC 作为对照。分别于注射后 0、24、72 h 扫描两侧后肢的腘窝淋巴结,MR 扫描在四川大学华西医院 Bruker Biospec 7 T 磁共振成

像仪上完成,测量序列采用压脂的 MGE(Multi-gradient echo), 参数:flip angle=90°, repetition time=1 000 ms, echo time=4 ms, 4 echoes, 8 averages; total acquisition time=22 min, slice=10(0.60 mm thickness; resolution=0.10×0.10 mm)。

1.2.8 组织病理学 72 h MR 扫描结束后,处死小鼠,摘取后肢腠窝淋巴结,固定后送检,切片分别行 HE 和普鲁士蓝染色。

2 结果

1.1 细胞培养

培养至第 3 天,皿底可见较多呈集落方式生长的贴壁细胞。第 6~7 天,出现大量悬浮细胞。第 8 天后,高倍镜下观察,在培养基的中下层可见许多形态特殊的悬浮和半悬浮细胞,特点为个体大、形态不规则、有伪足状突起(图 1)。收集悬浮细胞,显微镜下计数,可得到(3~5)×10⁷ 细胞/鼠,流式细胞仪检测 DC 表面分子标志 CD11c 的表达,结果高达 90%(图 1)。

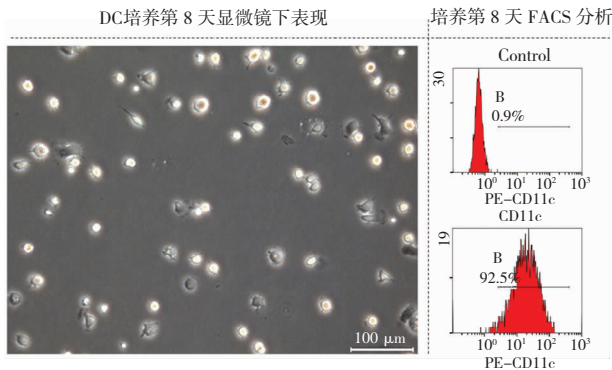


图 1 DC 的培养和 CD11c 表达水平的 FACS 分析

Fig.1 Generation of DC and FACS analysis of the expression level of CD11c

1.2 标记效果分析

普鲁士蓝染色后,于显微镜下观察,可见标记 DC 的胞浆区分布不同程度的蓝染颗粒,代表胞吞入浆的纳米探针团簇。相反,未标记的对照组细胞未见类似现象(图 2)。CLSM 进一步显示标记细胞的胞浆区有多量散在分布的绿色荧光颗粒,系内吞入胞的 SPIO 纳米颗粒(图 3)。

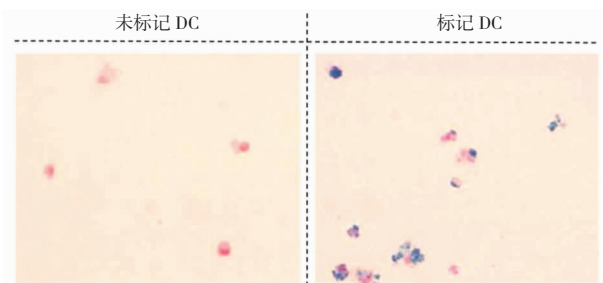


图 2 DC 磁标记前后的普鲁士蓝染色 (200×)

Fig.2 Perls' staining of DCs before and after probe labeling (200×)

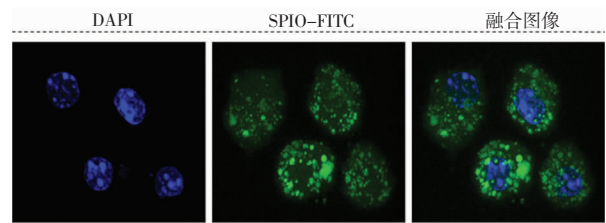


图 3 DC 标记后的共聚焦成像

Fig.3 CLSM imaging of SPIO-labeled DCs

1.3 FACS 检测

检测成熟 DC 标记前后的 CD80,CCR7 的表达,结果显示,探针标记和未标记 DC 的表达比率相仿(图 4),提示探针标记对 DC 的上述分子表达没有明显影响。

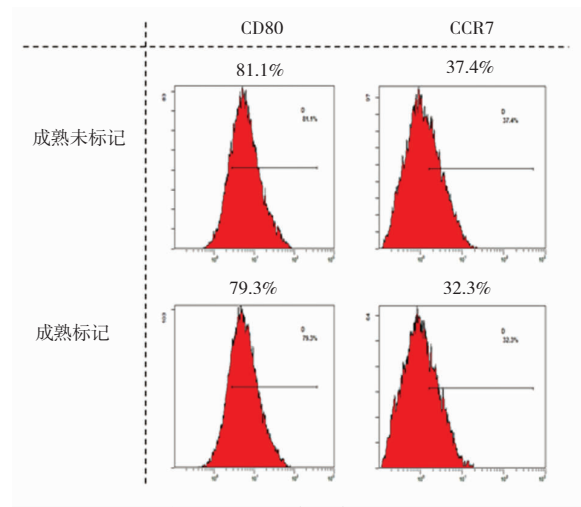


图 4 成熟 DC 标记前后的 FACS 分析

Fig.4 FACS analyses of DCs before and after labeling

1.4 DC 的体内 MR 示踪和组织病理学

于小鼠两侧后肢足底皮下注射 DC,右侧注射未标记探针的成熟 DC,左侧注射标记了探针的成熟 DC,注射后即行 MRI 扫描,两侧腠窝淋巴结均呈灰白色信号强度,淋巴结长约 1~2 mm。24 h 后扫描,两侧淋巴结增大。左侧淋巴结的中央带可见不规则低信号影;右侧淋巴结的信号变化则不明显。72 h 后,左侧淋巴结内低信号影增宽,融合成片,但信号较前略有回升(图 5)。此后处死小鼠,取腠窝淋巴结送病理检查,行普鲁士蓝染色。结果显示,左侧腠窝淋巴结内可见散在分布的细小蓝染颗粒,主要分布于淋巴结的中央带(图 6)。

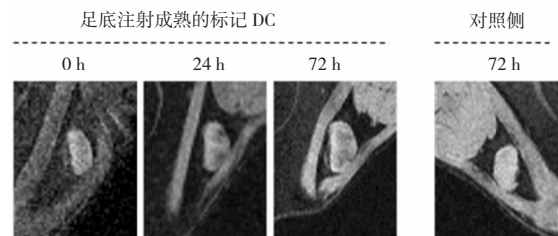


图 5 DC 归巢淋巴结的不同时间点 MR 成像

Fig.5 MRI of DC homing at different time points

淋巴结的普鲁士蓝染色

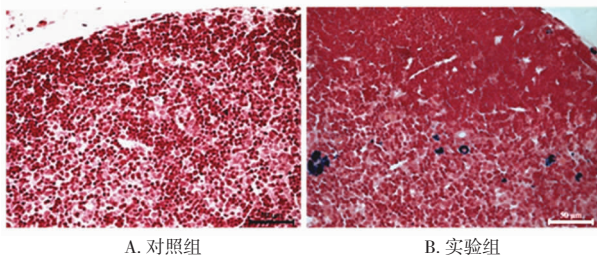


图 6 腓窝淋巴结的普鲁士蓝染色

Fig.6 Perls' staining of popliteal nodes

3 讨论

正确地传输细胞疫苗是细胞治疗成败的关键。利用 MRI 示踪疫苗细胞安全无创,且可提供细胞所在区域解剖的准确信息。本研究采用自制烷基化 PEI2k 包裹的 SPIO 颗粒标记 DC,用于示踪其体内迁移过程。有别于文献中常用的葡聚糖包裹的 SPIO 纳米颗粒^[4,8-9],烷基化 PEI2k 作为两亲性的阳离子聚合物,容易粘附于细胞表面,继而以团聚形式胞吞入浆,从而获得较高的标记效率,有利于成像敏感性的提高。本研究中,笔者采用 $7 \mu\text{g Fe/ml}$ 的探针浓度进行标记,结果,普鲁士蓝染色和 CLSM 均表明细胞内探针聚集充分。这一探针浓度,远低于文献中常用的标记量^[8-10]。为进一步了解标记过程对 DC 生物行为的影响,笔者检测了 CD80 和 CCR7 这 2 个重要分子标志物的表达,它们分别代表了成熟 DC 的迁移和抗原递呈 2 项功能。结果表明,标记前后,2 种分子的表达水平相仿,提示标记过程对相关生物行为的影响可能不大。体内 MR 成像发现,足底注射成熟 DC 后,24 h 即可见到淋巴结内低信号影,表明探针进入淋巴结内,低信号的分布主要集中在淋巴结中央带,则提示探针并非随淋巴液被动

回流,而是 DC 主动迁移归巢所致,这一结论也被组织病理检查证实,后者显示,探针主要分布于淋巴结中央区且聚集于细胞的胞浆内。此外,淋巴结的增大也暗示 T 细胞的激活增殖^[10-11]。由此可见,采用烷基化 PEI2k 包裹的磁纳米颗粒,可安全有效地标记 DC,用于其体内示踪研究。

参 考 文 献

- [1] Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(S1): S53-S60.
- [2] 曹新山,姜兴岳,毛锡金,等. DWIBS 评价 SPIO 标记树突状细胞治疗兔 VX2 肝癌的疗效[J]. *医学影像学杂志*, 2012, 22(9): 1550-1553.
- [3] 林嘉盈,李晓燕. 治疗头颈部肿瘤的树突状细胞疫苗的研究进展[J]. *医学综述*, 2010, 16(22): 3393-3396.
- [4] de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Barentsz JO, et al. Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(11): 1407-1413.
- [5] Liu G, Xie J, Zhang F, et al. N-Alkyl-PEI-functionalized iron oxide nanoclusters for efficient siRNA delivery[J]. *Small*, 2011, 7(19): 2742-2749.
- [6] Sun S, Zeng H, Robinson DB, et al. Monodisperse MFe_2O_4 (M=Fe, Co, Mn) Nanoparticles[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(1): 273e9.
- [7] 吴 昆,拜合提亚·阿扎提,王文光,等. 小鼠骨髓来源树突状细胞培养鉴定和诱导 T 淋巴细胞增殖[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(8): 1128-1133.
- [8] Kobukai S, Baheza R, Cobb JG, et al. Magnetic nanoparticles for imaging dendritic cells[J]. *Magn Reson Med*, 2010, 63(5): 1383-1390.
- [9] Verdijk P, Scheenen TW, Lesterhuis WJ, et al. Sensitivity of magnetic resonance imaging of dendritic cells for in vivo tracking of cellular cancer vaccines[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(5): 978-984.
- [10] Mou Y, Hou Y, Chen B, et al. In vivo migration of dendritic cells labeled with synthetic superparamagnetic iron oxide[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011(6): 2633-2640.
- [11] Rohani R, de Chickera SN, Willert C, et al. In vivo cellular MRI of dendritic cell migration using micrometer-sized iron oxide (MPIO) particles[J]. *Mol Imaging Biol*, 2011, 13(4): 679-694.

(责任编辑:关蕴良)