

大鼠胰岛细胞移植的磁共振监测

周碧婧¹ 何慧瑾^{1Δ} 冯晓源¹ 张善中² 杨艳梅¹

(¹复旦大学附属华山医院放射科 上海 200040; ²上海交通大学附属上海市第一人民医院移植中心 上海 200080)

【摘要】 目的 探讨磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)对超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)标记的胰岛细胞在大鼠肝脏内的成像方法,用于监测胰岛细胞移植术后移植物在大鼠体内的存活及排异情况。**方法** 采用GE 3.0T Signa Excite 磁共振扫描仪,配合3英寸小动物线圈。实验动物为20只雄性Wistar大鼠和5只雄性Lewis大鼠。将SPIO标记的胰岛细胞移植入大鼠肝脏内,未用SPIO标记的作为阴性对照,比较两组的差异。对SPIO标记后移植的大鼠分别用FSE T2WI序列和GRE T2*WI序列扫描,比较序列敏感性的差异。分别将取自Wistar大鼠和Lewis大鼠的胰岛细胞,用SPIO标记后移植入Wistar大鼠肝脏内,观察两移植组受体体内的胰岛细胞存活及排异的情况。将同基因移植组的大鼠于移植术后3月处死,异基因移植组的大鼠于移植术后3周处死,作病理切片,将所得结果与MRI的图像进行对照。**结果** 只有SPIO标记后的胰岛细胞可以被MRI监测到,表现为肝实质背景上的低信号点。GRE T2*WI较FSE T2WI序列对SPIO的监测更敏感。同基因移植组于移植后第1周、第2周及第3周的低信号点相对数量分别为(90.03±9.52)%、(92.87±18.21)%和(86.25±24.81)%,而异基因组的相对数量分别为(41.40±15.41)%、(33.41±14.01)%和(23.58±16.78)%。两组相对数量之间的差异具有显著的统计学意义($P<0.01$)。病理结果显示,标记后的胰岛细胞内确实存在铁颗粒,同基因移植组3月后在肝窦内仍能找到保存完好的移植物,而异基因组在移植后3周只有极少量的移植物残留。**结论** MRI能对大鼠体内SPIO标记的胰岛细胞进行成像,用于活体实时监测胰岛细胞移植术后移植物的存活及排异情况。

【关键词】 胰岛细胞移植; 磁共振; 超顺磁性氧化铁; 活体监测

【中图分类号】 R 587.1 **【文献标志码】** A

Tracking transplanted pancreatic islet cells in rats using magnetic resonance imaging

ZHOU Bi-jing¹, HE Hui-jin^{1Δ}, FENG Xiao-yuan¹, ZHANG Shan-zhong², YANG Yan-mei¹

(¹Department of Radiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China;

²Transplantation Center, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

【Abstract】 Objective To track superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled pancreatic islet cells in rats using 3.0T magnetic resonance imaging (MRI), and to detect the survival and rejection of grafts after transplantation. **Methods** Twenty male Wistar rats and 5 male Lewis rats were included in the study. SPIO-labeled pancreatic islet cells were tracked using a GE 3.0T Signa Excite MRI scanner with an animal coil. The images of SPIO-labeled islet cells in rats after transplantation were compared with those of the unlabeled ones. FSE T2WI sequence and GRE T2*WI sequence were used for the detection. The sensitivity of images for detection of grafts was also compared. SPIO-labeled pancreatic islet cells isolated from Wistar and Lewis rats were transplanted into the liver of Wistar rats. Afterwards, the survival and rejection of islet cells were observed sequentially in these two groups. The rats in the syngeneic group were sacrificed 3 months post-transplantation, while the rats in the allogeneic group were sacrificed 3 weeks post-transplantation. MRI of the grafts were correlated with the pathological results. **Results** SPIO-labeled pancreatic islet cells were seen on MRI as distinct homogenous, hypointense spots in the liver. GRE T2*WI were more sensitive to the detection of SPIO-labeled islet cells than FSE T2WI. The relative count of hypointense spots in the syngeneic group

were $(90.03 \pm 9.52)\%$, $(92.87 \pm 18.21)\%$ and $(86.25 \pm 24.81)\%$, respectively at 1 week, 2 weeks and 3 weeks after transplantation, while the relative count in the allogeneic group were $(41.40 \pm 15.41)\%$, $(33.41 \pm 14.01)\%$ and $(23.58 \pm 16.78)\%$, respectively. The difference between these counts was statistically significant ($P < 0.01$). Iron particles were detected only in the SPIO-labeled cells. Three months post-transplantation, the grafts were found well-preserved in the liver of the rats of the syngeneic group, while only a few grafts were found in that of the allogeneic group.

Conclusions MRI can be used to track SPIO-labeled islet cells *in vivo*, and has significant value in detecting the survival and rejection of grafts after transplantation in rats.

【Key words】 pancreatic islet cell transplantation; magnetic resonance imaging; superparamagnetic iron oxide; track *in vivo*

胰岛细胞移植技术是治疗1型糖尿病最有希望的方法之一,但移植后对体内胰岛细胞的监测较困难。目前可用来监测胰岛的影像技术包括正电子发射断层扫描仪(positron emission tomography, PET)、光学成像技术及磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)。因MRI具有无放射性、较高的软组织分辨能力和良好的重复性,与其他技术相比具有明显的优势。但直接观察体内的胰岛细胞是相当困难的,因为它的体积非常小,并且与周围组织信号差别小。超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)纳米分子探针,作为一种新型的MR对比剂,因具有良好的生物相容性和MRI信号敏感性而成为目前研究的热点。本研究将SPIO标记胰岛细胞,利用GE 3.0 T MRI监测标记后的细胞在体内的成像,从而观察移植术后受体内的胰岛细胞分布及排异的情况。

材 料 和 方 法

材料、试剂与设备 20只雄性Wistar大鼠和5只雄性Lewis大鼠,购自北京维通利华公司实验动物中心,体重280~350 g。SPIO(商品名Feridex, Advanced Magnetic公司);链脲霉素、PLL试剂(Sigma公司);胶原酶P(Roche公司);大鼠胰岛素ELISA试剂盒(Mercodia公司);兔抗大鼠胰岛素抗体(Abcam公司);HRP偶联羊抗兔抗体(Promega公司);3.0 Tesla 磁共振机(GE公司,Signa Excite机型)。

胰岛细胞移植 分别从Wistar和Lewis大鼠(各5只)胰腺组织内提取胰岛细胞,并用Feridex-PLL复合物在体外标记。采用链脲霉素(50 mg/kg)腹腔注射入15只Wistar大鼠体内,从而建立糖尿病动物模型。移植当日,大鼠麻醉后剖腹,经门脉主干插管,注入0.8 mL含1 200个胰岛的Hanks液,压迫止血后关腹。胰岛细胞经门脉分支移植入大鼠的肝脏中。分别施行同基因组(供体:Wistar大鼠;受体:糖尿病

Wistar大鼠; $n=8$)和异基因组(供体:Lewis大鼠;受体:糖尿病Wistar大鼠; $n=6$)胰岛移植。余下1只施行同基因组胰岛移植但未用Feridex标记,作为阴性对照。

Feridex 标记与未标记胰岛的监测 从Feridex标记的同基因移植组中任选1只大鼠,与未用Feridex标记的1只大鼠进行GRE T2 * WI序列扫描,参数设置:TR = 120 ms, TE = 4.4 ms, 矩阵 192×192 , FOV = 8 cm \times 8 cm, NEX = 6, 层厚 2.5 mm, 层数 = 10, 扫描时间 1 min 40 s。

扫描序列的选择 从Feridex标记的同基因移植组中任选1只大鼠,于移植术后第1天,分别用FSE T2WI和GRE T2 * WI序列对大鼠肝脏进行扫描。FSE T2WI序列参数设置:TR = 2 600 ms, TE = 82.60 ms, 矩阵 192×192 , FOV = 8 cm \times 8 cm, NEX = 6, 层厚 2.5 mm, 层数 = 10, 扫描时间 1 min 39 s。GRE T2 * WI序列参数设置:TR = 120 ms, TE = 4.4 ms, 矩阵 192×192 , FOV = 8 cm \times 8 cm, NEX = 6, 层厚 2.5 mm, 层数 = 10, 扫描时间 1 min 40 s。

监测胰岛移植的排斥反应 同基因移植组($n=6$)和异基因移植组($n=6$)分别于移植术后第1天、第1周、第2周和第3周行肝脏MRI检查。采用GRE T2 * WI序列,参数设置:TR = 120 ms, TE = 4.4 ms, 矩阵 192×192 , FOV = 8 cm \times 8 cm, NEX = 6, 层厚 2.5 mm, 层数 = 10, 扫描时间 1 min 40 s。标记的胰岛或者胰岛细胞团表现为肝脏中的低信号点(小黑点)。计数每一个层面中的黑点数,共10个层面,作为检测到的胰岛或胰岛细胞团总数。术后第1天的胰岛数记为100%,分别将第1周、第2周和第3周的数值与第1天的数值相除,得到这些时间点胰岛的相对数量。采用配对 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

病理和免疫组化染色 同基因移植组动物于移植后3月处死,异基因组动物于移植后3周处死,未用Feridex标记的对照鼠于移植后3 d处死。收集

肝脏标本,作 4 μm 厚石蜡切片。用 EDTA 溶液微波炉加热,修复抗原。随后加兔抗大鼠胰岛素抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,随后用 PBS 洗涤 2 次,加 HRP 偶联羊抗兔抗体,室温反应 1 h 后,PBS 洗涤 2 次,DAB 底物。这是个两步法反应,胰岛素阳性的细胞,胞质被着色成棕色。切片随后作普鲁士兰染色。

结 果

Feridex 标记与未标记胰岛图像的比较 未用 SPIO 标记的胰岛不能在 MRI T2 * WI 图像检测到(图 1A),而用 Feridex-PLL 复合物标记的胰岛,则表现为肝实质背景上的低信号点(图 1B)。

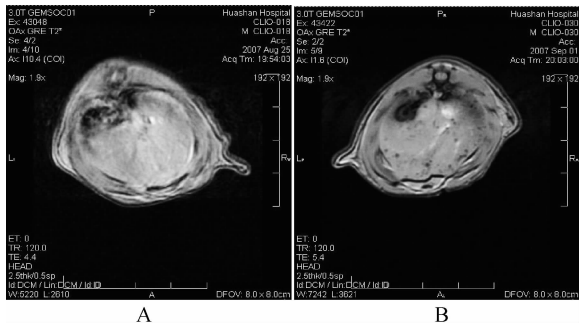


图 1 Feridex 未标记与标记后的大鼠胰岛图像
Fig 1 Feridex unlabeled and labeled pancreatic islet cells in liver of rats
A:Unlabeled; B:Labeled

FSE T2WI 序列和 GRE T2 * WI 序列监测胰岛的敏感性 FSE T2WI 序列扫描得到的图像肝实质

背景较暗淡,很难找到低信号点的存在(图 2A),而 GRE T2 * WI 序列的图像上,低信号点与肝实质背景的对比度明显强烈,使低信号点显示得更清晰(图 2B)。

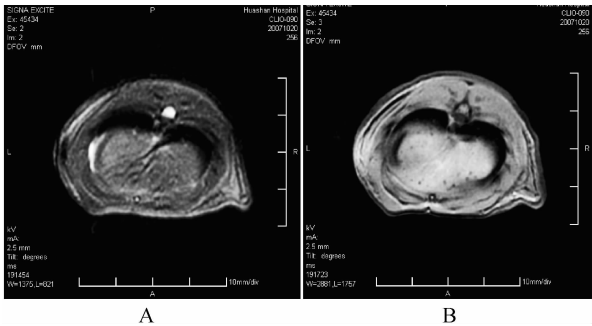


图 2 FSE T2WI 序列和 GRE T2 * WI 序列扫描得到的大鼠肝脏图像
Fig 2 FSE T2WI and GRE T2 * WI images of the liver of rats
A:FSE T2WI; B:GRE T2 * WI

胰岛移植物的排斥反应 同基因移植组胰岛细胞数量减少得并不明显,异基因移植组的胰岛细胞数量从第 1 周开始就明显减少,至移植后第 3 周大部分动物体内已监测不到胰岛细胞的存在(图 3)。同基因移植组于移植术后第 1 周、第 2 周及第 3 周的低信号点相对数量分别为 $(90.03 \pm 9.52)\%$ 、 $(92.87 \pm 18.21)\%$ 和 $(86.25 \pm 24.81)\%$,而异基因组的相对数量分别为 $(41.40 \pm 15.41)\%$ 、 $(33.41 \pm 14.01)\%$ 和 $(23.58 \pm 16.78)\%$ (图 4)。两组相对数量之间的差异具有显著的统计学意义($P < 0.01$)。

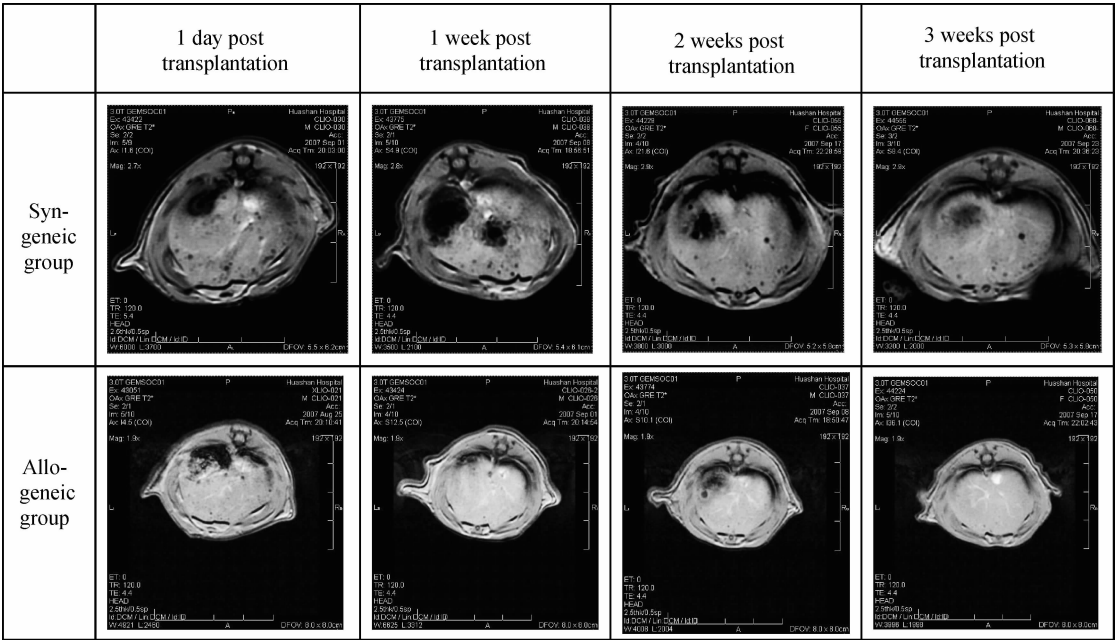


图 3 同基因移植组及异基因移植组在移植术后监测到的肝脏图像
Fig 3 The images of rats' liver in syngeneic group and allogeneic group post pancreatic islet cells transplantation

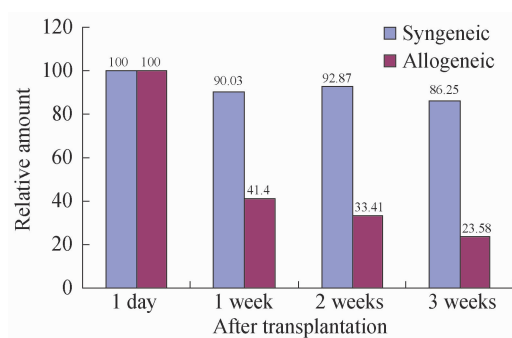


图 4 移植术后同基因与异基因移植组随访到的胰岛相对数量

Fig 4 Comparison of relative amounts of pancreatic islet cells in syngeneic group and allogeneic group after transplantation

病理和免疫组化染色结果 Feridex 标记的动物体内确实有被染成蓝色的铁颗粒存在,并被胰岛细胞所摄取,而未标记的胰岛细胞内没有见到铁颗粒(图 5A、B)。在异基因组的 6 只实验动物中,只有 2 只体内找到少量残留的胰岛移植物,而在同基因组动物体内,移植后 3 个月仍然可以在肝窦中找到保存完好的胰岛移植物(图 5C、D)。

讨 论

胰岛细胞移植技术是目前最有前景的治疗1型

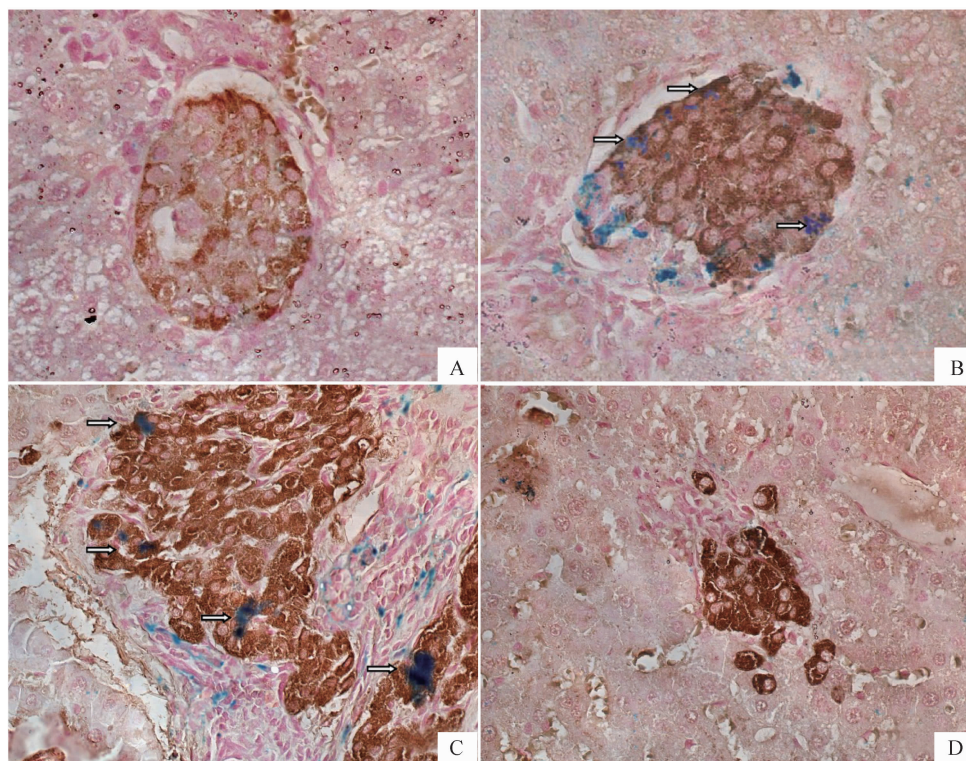


图 5 病理和免疫组化染色结果(×200)

Fig 5 Histology and Immunochemical staining (×200)

Iron localization (arrow) and insulin activity (brown) were observed by combined staining with an anti-insulin antibody and Prussian blue. A: Feridex unlabeled islet cells; B: Feridex labeled islet cells; C: Islet cells of syngeneic group 3 months post transplantation; D: Islet cells of allogeneic group 3 weeks post transplantation.

糖尿病的方法,但因移植术后的免疫排斥反应常导致移植物的凋亡和坏死,而使手术失败。因此,若能直接观察到受体内的胰岛移植物,实时监测其分布、存活的情况及排斥反应的发生情况,则能更为直观地评价移植物的功能。随着纳米粒子合成技术的发展,纳米粒子用于生物分子标记已成为研究的热点,对于疾病的诊断和治疗有重要的意义^[1]。SPIO 是一种新型的 MRI 对比剂,其对细胞无毒,并且具有良好的生物相容性和 MRI 信号敏感性。经大量实验研究证实,SPIO 在器官移植在体监测中能够发挥重要作用^[2]。

本研究将 SPIO 标记与未标记的胰岛细胞图像进行比较,SPIO 标记后的大鼠肝脏内可以看到弥漫分布的低信号点,而没有标记的胰岛细胞是不能被监测到的。经病理实验证实,SPIO 标记后移植的细胞内散在分布着染成蓝色的铁颗粒,而未标记的胰岛细胞内没有发现这样的颗粒存在,说明 SPIO 标记细胞后,铁颗粒经细胞的摄取作用存在于细胞内,又由于其具有超顺磁性,而在 MRI 扫描时表现为低信号的黑点。这一结果说明 SPIO 标记胰岛细胞的技术可以用于在 MRI 上观察移植术后胰岛细胞在动物体内的分布情况。

SPIO 是以缩短 T2 为主的^[3],扫描序列应选择 T2WI。本研究将 FSE T2WI 序列和 GRE T2 * WI 序列进行了比较,发现 GRE T2 * WI 序列中肝实质背景的对比度明显较强,低信号点显示明显清晰。这是因为 GRE 使用极性相反的去相位梯度场和再聚焦梯度场致横向弛豫再聚焦,不使用 180°脉冲,故对 SPIO 的磁敏感效应更为敏感^[4]。GRE 序列由于屏气快速成像,其信噪比常不如 SE 序列,但由于对磁场不均匀性非常敏感,所以增强后具有极好的对比噪声比,弥补了信噪比方面的不足。T2 * WI 为 SPIO 提供的敏感性最强,但同时对于气-液界面、血流、内生铁蛋白的沉积所产生的背景场的不均匀性也非常敏感,其特异性是比较低的^[5]。因此, GRE T2 * 序列能同时获得最高敏感度和相对高的特异度。

近年来,国外已有一些相关的研究,如 Kriz 等^[6]用超顺磁性氧化铁颗粒 Ferucarbotran 对胰岛细胞进行标记,并将实验动物分成同基因及异基因移植组,发现异基因组从移植术后第 2 周开始低信号点数量明显减少。本研究用 Feridex 标记胰岛细胞,发现同基因组的胰岛细胞数量在随访的 3 周时间里减少的并不明显,而异基因移植组动物体内的胰岛细胞于移植术后第 1 周就明显减少。经病理实验证实,异基因移植组移植后 3 周的大鼠肝脏内只能找到少量的胰岛移植体残留,而同基因移植组在移植术后 3 个月的大鼠肝脏内仍能找到保存完好的胰岛移植体。说明在异基因移植组中因发生了强烈的免疫排斥反应,导致大量胰岛细胞死亡,凋亡坏死的胰岛细胞因释放出了铁颗粒,在 MRI 图像上表现为低信号点的数量明显减少。从影像学的角度看,释放入肝实质的铁颗粒因数量极少,分布广泛,并迅速被肝脏的 Kuppfer 细胞吞噬^[7],又由于肝脏的代谢作用而将此物质从肝脏中快速清除,在 MRI 图像上是不会产生假阳性的。相比之下,有活性的胰岛细胞经内吞作用聚集了大量的铁颗粒,并由细胞膜将其分隔开,从而会产生明显的低信号点^[6]。因此,在肝脏内能以高浓度稳定地储存铁的唯一实体是有活性的胰岛细胞。

在 Koblas 等^[8]的研究中,他们发现在同基因移植组移植术后 12 周,这些用于标记细胞的氧化铁颗粒仍然可以在磁共振上观察到。说明 SPIO 的标记时间是相当长的,可以用于长期的监测和随访。据

此,胰岛细胞被 SPIO 标记后再移植入受体内,MRI 不仅可以观测到胰岛细胞在肝门系统的分布情况,并且可以用于长期监测其存活及发生排异的情况。

这一技术属于分子影像学领域,目前尚在动物实验阶段,其能否用于人体还在研究中。从目前临床应用来看,SPIO 的临床剂量远小于其毒性的阈值,而本研究标记胰岛细胞的量又远小于 SPIO 的临床用量。研究表明^[9],SPIO 对胰岛的存活没有任何副作用,也没有影响标记的胰岛细胞分泌胰岛素的功能。故预测此项技术可应用于人体,对移植的胰岛细胞进行标记,无创监测移植体在受体内存活和排异情况。

参 考 文 献

- [1] 徐抒平,王连英,徐蔚青,等. SERS 标记纳米粒子用于免疫识别[J]. 高等学校化学学报,2003,24(5):900-902.
- [2] Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging[J]. *NMR Biomed*, 2004, 17(7): 484-499.
- [3] Shamsi K, Balzer T, Saini S, *et al.* Superparamagnetic iron oxide particles (SHU555A): evaluation of efficacy in three doses for hepatic MR imaging[J]. *Radiology*, 1998, 206(2): 365-371.
- [4] Van Beers BE, Lacrosse M, Jamart J, *et al.* Detection and segmental location of malignant hepatic tumors: comparison of ferumoxide-enhanced gradient-echo and T2-weighted spin-echo MR imaging[J]. *AJR*, 1997, 168(3): 713-717.
- [5] Kuhlpete R, Dahnke H, Matuszewski L, *et al.* R2 and R2 * mapping for sensing cell-bound superparamagnetic nanoparticles: *in vitro* and murine *in vivo* testing[J]. *Radiology*, 2007, 245(2): 449-457.
- [6] Moore A, Marecos E, Bogdanov A, *et al.* Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model[J]. *Radiology*, 2000, 214(2): 568-574.
- [7] Reimer P, Balzer T. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications[J]. *Eur Radiol*, 2003, 13(6): 1266-1276.
- [8] Koblas T, Girman P, Berkova Z, *et al.* Magnetic resonance imaging of intrahepatically transplanted islets using paramagnetic beads[J]. *Transproceed*, 2005, 37(9): 3493-3495.
- [9] Tai JH, Foster P, Rosales A, *et al.* Imaging islets labeled with magnetic nanoparticles at 1.5 Tesla[J]. *Diabetes*, 2006, 55(11): 2931-2938.

(收稿日期:2009-04-17;编辑:王蔚)