

9.4 T MR波谱检测间充质干细胞成骨分化代谢特征的研究

洪璧楷¹, 代海洋², 肖叶玉¹, 吴仁华^{1*}

基金项目:

国家自然科学基金重点项目(30930027); 广东省医学科研项目(A2011405)

作者单位:

1. 汕头大学医学院第二附属医院影像中心, 汕头 515041
2. 惠州市中心人民医院影像科, 惠州 516001

通讯作者:

吴仁华, E-mail: rhwu@stu.edu.cn

收稿日期: 2013-08-22

接受日期: 2013-10-08

中图分类号: R445.2; R318

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8034.2013.06.008

洪璧楷, 代海洋, 肖叶玉, 等. 9.4 T MR波谱检测间充质干细胞成骨分化代谢特征的研究. 磁共振成像, 2013, 4(6): 437-440.

[摘要] 目的 研究间充质干细胞向成骨细胞分化的高分辨MR波谱(MRS)代谢特征。**材料与方法** 培养获取间胎儿脐带充质干细胞, 建立体外诱导间充质干细胞向成骨细胞分化的模型, 利用甲醇/氯仿获取细胞代谢提取物, 经处理后利用9.4 T高分辨率MRS检测代谢提取物频谱特征。**结果** 诱导间充质干细胞向成骨细胞分化前后, 位于2.02 ppm及2.25 ppm的脂质峰明显减低, 且在1.77 ppm出现一新的代谢峰, 该代谢峰可能为亮氨酸。**结论** 间充质干细胞成骨分化后MRS具有一定特征, 位于1.77 ppm的代谢峰可能做为间充质干细胞成骨分化的生物学标识。

[关键词] 间质干细胞; 磁共振波谱学; 成骨细胞; 代谢

9.4 T MR spectroscopy detection of mesenchymal stem cells into osteoblasts metabolism characteristics

HONG Bi-kai¹, DAI Hai-yang², XIAO Yu-ye¹, WU Ren-hua^{1*}

¹Medical Imaging Center, the 2nd Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China

²Department of Medical Imaging, Huizhou Municipal Central Hospital, Huizhou 516001, China

*Correspondence to: Wu RH, Email: rhwu@stu.edu.cn

Received 22 Aug 2013, Accepted 8 Oct 2013

Abstract Objective: To explore the metabolite profile of mesenchymal stem cells (MSCs) underwent osteogenic differentiation using 9.4 T high resolution MR spectroscopy. **Materials and Methods:** Human umbilical cord mesenchymal stem cells were cultured and collected. MSCs were induced osteogenic differentiation for 2 weeks and cell metabolite extractions were prepared by methanol-chloroform (M/C) method. Cell extractions were then analyzed on a 9.4 T MRS device. **Results:** After osteogenic induction, the fatty acid metabolite peak at 2.02 ppm and 2.25 ppm obviously decreased, and there appeared a new metabolite peak at about 1.77 ppm, which is most probably representative of leucine. **Conclusions:** There are some specific characteristics on MRS of MSCs underwent osteogenic differentiation. The new arised peak at 1.77 ppm may serve as the biomarker for mesenchymal stem cells osteogenic differentiation.

Key words Mesenchymal stem cells; Magnetic resonance imaging; Staining and labeling; Gadolinium DTPA; Animals, laboratory

MR频谱(MR spectroscopy, MRS)技术可无创地检测活体组织或细胞的代谢物特征及变化, 进而推断细胞、组织及器官的生理功能及状态变化。高场MRS可以检测到细胞及组织生理过程出现的早期及较微小的代谢特征, 为在体研究打下坚实的基础。

笔者利用9.4 T高场MRS检测离体间充质干细胞向成骨细胞分化后细胞代谢提取物的频谱及其变化特征, 寻找间充质干细胞成骨分化的生物学标识, 为MRI技术运用于干细胞及骨组织工程学

研究做一定基础。

1 材料与方法

1.1 间充质干细胞的培养

间充质干细胞(MSCs)来源于胎儿脐带的华尔通氏胶组织, 脐带取自汕头大学医学院第二附属医院产科, 为健康足月剖宫产胎儿脐带, 去羊膜表皮及血管, 取华尔通氏胶, 剪碎为1 mm³大小的组织块, 将其贴壁于底部经由多聚赖氨酸处理的塑质培养瓶中, 加原代完全培养液约10 ml(含10% FBS、F12生长因子及低糖DMEM), 置温暖湿润

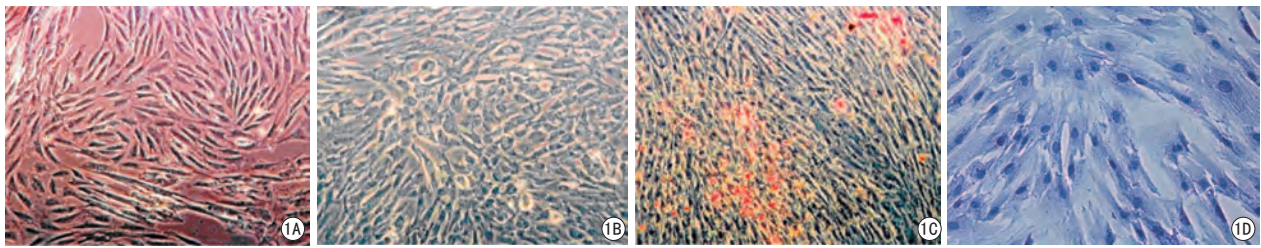


图1 间充质干细胞向成骨细胞分化形态及染色特征。A: 间充质干细胞呈贴壁梭形生长(×100); B: 成骨诱导2周细胞变圆(×100); C: 茜素红染色见红染的钙结节(×100); D: 碱性磷酸酶染色见胞浆内蓝染颗粒(×200)

Fig. 1 Morphological and staining characteristic of MSCs underwent osteogenic differentiation. A: MSCs were adherent and spindle-like cells (×100). B: MSCs turned round after 2 weeks' induction (×100). C: Alizarin red staining showed red-stained calcium nodules (×100). D: AKP staining showed blue-staining particles in the cytoplasm (×200).

的CO₂培养箱中(37℃, 5%CO₂)行原代培养, 约2周后原代间充质细胞从组织块周围长出。新生细胞呈贴壁生长, 待细胞生长至70%~80%融合时进行传代培养。本实验所用的人脐带间充质干细胞的分离及纯化采用目前公认的贴壁筛选法, 利用MSCs对塑料培养材料具有较强黏附性特性分离培养出高纯度的MSCs, 用流式细胞仪监测干细胞表面分子标记, 表明扩增后的MSCs的纯度可以达到95%以上^[1-2]。

1.2 体外诱导间充质干细胞向成骨细胞分化

按照文献[3]介绍制备成骨分化诱导培养液, 在低糖DMEM培养基中加0.1 μmol/L地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠和50 μg/ml维生素C配成成骨分化诱导液。取2~3代的间充质干细胞, 在细胞传代培养时换加成骨诱导液, 以后每2~3 d换液一次。成骨诱导模型的鉴定采用茜素红钙结节染色及碱性磷酸酶染色, 方法参照试剂盒说明进行。

1.3 细胞代谢物的提取

利用甲醇/氯仿提取间充质干细胞的脂溶性代谢物(间充质干细胞的代谢物和间充质干细胞向成骨细胞分化后的代谢物), 采用改良的Folsh等的方法^[4-5], 用细胞刮刀刮取收集 1.0×10^6 的细胞, 离心弃上清, 向细胞沉淀中加入体积比为1:2预冷的甲醇/氯仿1.5 ml, 冰浴中进行超声碎裂5 min(功率为450 W, 工作2 s, 停1 s), 然后再向混合液中加入0.5 ml蒸馏水, 震荡混匀后置高速离心机离心, 离心环境0℃、13000 rpm, 时间为20 min。离心后溶液分层, 其中上层液为甲醇和水的混合物, 下层为氯仿层, 用移液器小心分离吸取氯仿层溶液, 置于另一离心管内用高纯氮气吹干。

1.4 高场MRS检测及后处理

取干燥的细胞提取物样本加入0.5 ml含一定量内标为TMS的氘代氯仿, 充分溶解后移入直径为5 mm的核磁共振测试管内, 置入Burker 9.4 T (400 MHz, Bruker Avance, Switzerland) MR仪探头内。用机器自带氢质子频谱zgpr采集序列, 机器自匀场, 带宽为5 KHz, TR值为20 s, 重复扫描32次, 数据采集点为4096。原始数据经傅里叶转换、相位及基线校正后输出。

后处理使用Bruker自带核磁软件Mestrec4.7, 对波峰下面积进行积分及分析。

2 结果

2.1 间充质干细胞成骨分化特征

倒置显微镜下观察, 间充质干细胞形态呈梭形、漩涡状生长, 体外诱导间充质干细胞向成骨细胞分化2周后, 间充质干细胞形态发生变化, 细胞体积变圆, 排列密集且逐渐出现细胞重叠现象, 在重叠的细胞之间出现散在点状高亮沉积物, 茜素红染色为显著红染的钙结节沉积, 碱性磷酸酶(AKP)染色见胞浆内蓝色颗粒为阳性表达的碱性磷酸酶(图1)。

2.2 间充质干细胞成骨分化前后MRS变化特征

诱导间充质干细胞向成骨细胞分化后, 其最显著的MRH变化是位于1.77 ppm附近出现一新的代谢峰, 而位于2.02 ppm及2.25 ppm的脂质峰明显减低, 位于0.89 ppm和1.28 ppm的脂质峰无明显改变(图2)。

3 讨论

成骨细胞是骨形成的主要功能细胞, 负责骨基质的合成、分泌和矿化。成骨细胞起源于多能

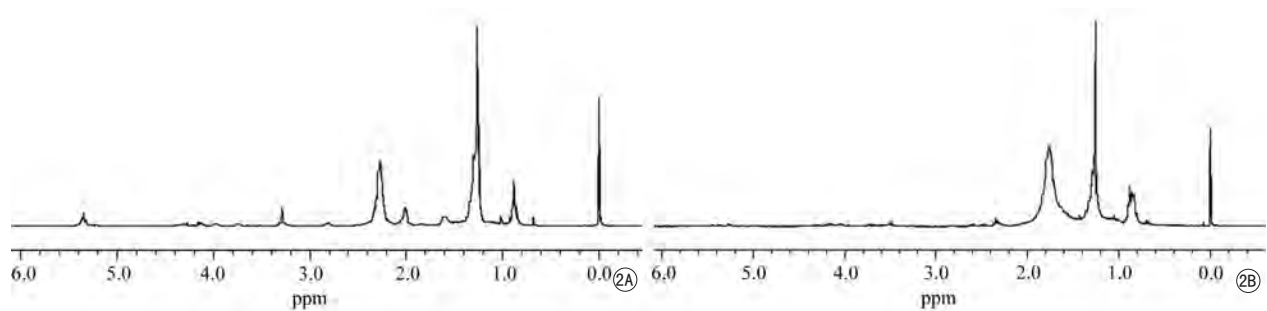


图2 间充质干细胞及成骨分化后频谱特征。A: 间充质干细胞代谢物频谱特征; B: 间充质干细胞成骨分化后频谱特征, 分化后1.77 ppm处出现一新的代谢峰, 2.02 ppm和2.25 ppm代谢峰下降

Fig. 2 Metabolite profile of MSCs underwent osteogenic differentiation. A: Metabolite profile of MSCs. B: Metabolite profile of MSCs after induced osteogenic differentiation, there arised a new peak at 1.77 ppm and the peak at 2.02 ppm and 2.25 ppm decreased.

的骨髓基质的间充质干细胞, 除成骨细胞外, 间充质干细胞还可分化成软骨细胞, 成纤维细胞, 脂肪细胞或肌细胞, 成骨细胞是由多能的间充质干细胞在体内各种调控因素的调节下分化而来的^[6-7]。在离体培养环境下可以模拟成骨诱导分化条件进而诱导间充质干细胞向成骨细胞分化, 最常采用的就是利用地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素C配制成的诱导液, 对间充质干细胞进行离体培养, 在此环境下间充质干细胞逐渐表达并分泌I型胶原酶、碱性磷酸酶等并发生相应的形态变化及形成钙结节等。笔者采用通用成熟的诱导方法, 离体培养2~3周后间充质干细胞逐渐合成分泌碱性磷酸酶及I型胶原酶并形成钙结节, 证明本实验模型成功。

诱导间充质干细胞向成骨细胞分化后, 其最显著的MRS变化是位于1.77 ppm附近出现一新的代谢峰。由于既往未见有对此代谢峰的报道, 结合频谱数据库及相关文献笔者推测该代谢峰可能为亮氨酸^[8-10]。因在间充质干细胞向成骨细胞诱导分化的过程中, 间充质干细胞逐渐表达分泌胶原蛋白酶, 胶原蛋白是一种结晶纤维蛋白原, 在骨骼中其被包埋在含有钙盐的基质中。胶原的分子结构为3条多肽链, 每一条链含有一千多个氨基酸, 分子量为95 KU。这3条肽链交织呈绳状, 故又称三联螺旋结构, 具有该特点的有一群氨基酸, 如丙氨酸、亮氨酸、甘氨酸、精氨酸、谷氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸等, 其总氮量为18.45%^[11]。丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸是非极性氨基酸, 其较易溶于水而难溶于非极性溶剂氯仿, 而亮氨酸为非极性氨基酸且由于其R基

结构的高度对称性, 在氯仿中有一定的溶解度, 且亮氨酸的化学位移位于1.77 ppm左右, 故笔者推测在1.77 ppm附近出现的明显代谢峰最可能为亮氨酸。

频谱中其他代谢峰亦出现一定的变化, 位于2.02 ppm及2.25 ppm的脂质峰明显减低, 位于0.89 ppm和1.28 ppm的脂质峰无明显改变。细胞的脂质信号主要来源于细胞的磷脂分子层、脂蛋白及细胞浆内的脂质成分, 脂质代谢峰的变化提示间充质干细胞向成骨细胞分化过程中细胞膜及细胞浆的结构和成分可能发生了一定的变化。虽然MRS不能确定该变化的具体形式, 但MRS所提供的信息可引导我们进一步探索研究。

综上所述, 高场MRS可以敏感地检测干细胞代谢物, 进而反映细胞的生理及功能状态, 间充质干细胞向成骨细胞分化时在1.77 ppm附近出现一新的代谢峰, 该代谢峰可能是干细胞成骨分化的生物学标识, 脂质峰的变化亦可以为间充质干细胞成骨分化提供参考。

参考文献 [References]

- [1] Dai HY, Xiao YY, Hong BK, et al. Metabolite features of the human umbilical cord mesenchymal stem cells on 9.4 T MR spectroscopy. *Chin J Med Imaging Technol*, 2011, 27(10): 1953-1957. 代海洋, 肖叶玉, 洪璧楷, 等. 9.4 T MRS观察人脐带间充质干细胞代谢特征. *中国医学影像技术*, 2011, 27(10): 1953-1957.
- [2] Hwai-shi W, Shih-chieh H, Shu-tine P, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 2004, 22(7):1330-1337.
- [3] Sun GD, Wu SX, Li ZZ. Isolation, culture and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord. *J Clin Rehabil Tissue Engineer Res*, 2010, 14(1): 33-37.
- [4] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37(8): 911-917.
- [5] Dai HY, Hong BK, Xiao YY, et al. Extraction methods optimization in

- high-field MRS study of the human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Chin J Magn Reson Imaging*, 2011, 2(6): 430-434.
- 代海洋, 洪璧楷, 肖叶玉, 等. 用于高场MRS研究的人脐带间充质干细胞代谢物提取方法选择的优化. *磁共振成像*, 2011, 2(6): 430-434.
- [6] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Stem cells multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284(2): 143-147.
- [7] Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2): 341-347.
- [8] Martnez-Bisbal MC, Mart-Bonmat L, Piquer J, et al. 1H and 13C HR-M AS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo 1H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed*, 2004, 17(4): 191-205.
- [9] Sitter B, Sonnewald U, Spraul M, et al. High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue. *NMR Biomed*, 2002, 15(5): 327-337.
- [10] Manganas LN, Zhang X, Li Y, et al. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science*, 2007, 318(5852): 980-985.
- [11] Hulmes DJ. Building collagen molecules, fibril, and suprafibrillar structures. *J Struct Biol*, 2002, 37(1-2): 2-10.

资讯 Information

2013年《磁共振成像》杂志编委和审稿专家会议纪要

2013年9月13日,《磁共振成像》杂志编委和审稿专家会议在开封市中州国际饭店中原厅召开,郭启勇副主编、田捷副主编、祁吉副主编、赵斌副主编、贾文霄副主编等110余位编委和审稿专家出席了会议。会议由郭启勇教授主持,田捷教授受戴建平主编委托做了工作报告。

戴建平主编的工作报告指出,2012年是“十二五”规划第2年,是国家文化体制改革的关键一年,也是《磁共振成像》杂志迈向国际化品牌期刊的关键时期。在主办单位中国医院协会和北京天坛医院的指导下,在国家卫生计生委关怀下,在编委、审稿专家们共同努力下,《磁共振成像》杂志策划优秀专题、积极开展国际交流与合作,深受海内外专家的好评,为今后走向美国SCI数据库打下了坚实的基础。磁共振成像杂志应该深入开展磁共振成像诊疗路径调查研究,推广磁共振诊断规范,主办磁共振相关技术研讨会,推广临床适用磁共振技术,推动“政、产、学、研、用、资”合作,推动我国磁共振产业技术发展。戴主编指出:磁共振成像杂志今后应加强与国际、国内学术团体、著名国际数据库、期刊杂志的交流,努力为我国磁共振医生创造交流、合作的国际平台!

贺光军社长总结了创刊以来编委、审稿专家们对杂志做出的重要贡献:1、薛敏博士、胡坤坪总经理、梁长虹教授、徐坚民教授、郑海荣所长、孙国平院长、伍建林教授、陈敏教授、吴仁华教授、李澄教授、王滨院长、程敬亮教授、金征宇教授等专家对杂志社主办学术会议给予了大力支持。2、伍建林、杨健、艾林、王小宜、张小明、王光彬、金真、吴仁华、李澄、黄力教授等组织的稿件刊发后被引频次位居前十名。3、金

征宇、卢光明、王振常、胡小平、周纯武、徐文坚、陈敏、刘新、许建荣、伍建林、马林、赵世华、薛华丹、鲜军舫教授等专家为杂志组织了优秀的专题稿件。4、刘怀军、杜湘珂教授等专家为杂志栏目设置提出了良好的建议。5、戴建平、冯晓源、李坤成、张兆琪、武乐斌、周纯武、罗娅红、刘怀军、王振常、卢光明、贾文霄、陈敏、程敬亮、许建荣、李明华、曾蒙苏、吴仁华、苑纯、宋无名、殷玉明、龙莉玲、屈辉、唐桂波、江新青、赵世华、马林、彭卫军、刘佩芳、汪登斌、李宏军、潘诗农、欧阳汉、马军、彭芸、冯逢、王梅云、郑卓肇、薛华丹、刘影、钱银峰、王良、牛金亮、刘新、李洁、尹建忠、靳二虎、苗延巍、孟晓春、张体江、何之彦教授等50余位著名专家以第一作者为杂志撰稿,扩大了杂志影响力。6、梁碧玲、章士正、屈辉教授等老前辈积极、认真为杂志撰写讲座稿件,无私奉献自己的丰富经验给读者。7、祁吉、高家红、田捷、赵斌、臧玉峰教授等绝大多数编委和审稿专家认真为杂志审稿。8、戴建平、郭启勇、胡小平、周志诚、谭国升、程晓光教授等专家积极为杂志组织海外优秀稿件。

贺社长对比分析了《磁共振成像》杂志与国内同行期刊论文的引用情况,分析了进入美国Medline、美国SCI等国际权威数据库的差距,明确了编委、审稿专家今后为杂志工作的重点。

与会专家为杂志发展提出了很多有益的意见和建议。

会议还讨论了其他事宜。

(供稿:王志强)