

SPIO 标记下大鼠骨髓间充质干细胞生物学特性及 多向分化潜能及体外 MR 成像

许杰华, 李丹, 于春鹏, 周斌, 颜荣华, 王劲, 朱康顺, 单鸿*
(中山大学附属第三医院放射科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨超顺磁氧化铁纳米颗粒(SPIO)标记对骨髓间充质干细胞生物学特性和多向分化潜能的影响以及体外磁共振(MRI)成像的可行性,为移植干细胞活体 MRI 成像提供实验基础。【方法】采用梯度密度离心法和贴壁法获取大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC),采用 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SPIO 联合 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多聚赖氨酸(PLL)标记 BMSC,比较标记和未标记 MSC 细胞活力、增值、细胞周期、凋亡和成骨、成脂多向分化能力;应用 1.5T MR 对不同数量级细胞分别进行 $T_1\text{WI}$ 、 $T_2\text{WI}$ 和 $T_2^* \text{WI}$ 序列扫描。【结果】普鲁士兰染色显示 SPIO(25 $\mu\text{g Fe}/\text{mL}$, 48 h)对细胞的标记率接近 100%,细胞活力、增殖、周期和凋亡检测,均显示 SPIO 标记细胞与未标记细胞间无统计学差异($P > 0.05$);成骨、成脂诱导显示,BMSC 和标记 BMSC 均具备成骨、成脂分化能力;对不同数量级的 SPIO 标记 BMSC 行 MR 扫描, $T_1\text{WI}$ 、 $T_2\text{WI}$ 和 $T_2^* \text{WI}$ 能检测到的最小数量级细胞分别为 2×10^4 、 1×10^4 、 0.5×10^4 ,呈低信号。【结论】25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SPIO 联合 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PLL 能有效标记 BMSC,不影响 BMSC 的活力、增值、细胞周期、凋亡和多向分化能力,1.5T MR 示踪标记细胞可行,与 $T_1\text{WI}$ 和 $T_2\text{WI}$ 序列相比, $T_2^* \text{WI}$ 最敏感。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 超顺磁性氧化铁粒子; 磁共振成像; 标记

中图分类号: R455.2, R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)02-0142-06

Biological Characteristics, Multiple Differentiation Potential, and in Vitro MRI of Superparamagnetic Iron Oxide Labeled Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells from Rats

XU Jie-hua, LI Dan, YU Chun-peng, ZHOU Bin, YAN Rong-hua, WANG Jin,
ZHU Kang-shun, SHANG Hong

(Department of Radiology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objectives】To investigate the effects of superparamagnetic iron oxide (SPIO) labeled bone-derived mesenchymal stem cells (BMSC) on their biological characteristics, multiple differentiation potential, and the feasibility of in vitro MR imaging, and to provide experimental basis for MR imaging in transplanting stem cells in vivo.【Methods】BMSC were obtained by density gradient centrifugation and adhesive-screening methods and labeled with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SPIO combined with 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ poly-L-lysine (PLL). Cell viability, proliferation, cell cycle, apoptosis, multiple differentiation ability of osteogenesis and adipogenesis between labeled and unlabeled BMSC were compared. Different numbers of BMSCs were screened by 1.5T MRI with $T_1\text{WI}$, spin echo (SE) $T_2\text{WI}$, and gradient-recalled echo (GRE) $T_2^* \text{WI}$ sequences.【Results】The labeling efficiency of SPIO (25 $\mu\text{g Fe}/\text{mL}$, 48 h) was close to 100% according to Prussian blue staining. No statistically significant differences were found in cell viability, proliferation, cell cycle, apoptosis between labeled and unlabeled cells ($P > 0.05$). Osteogenic and adipogenic inductions demonstrated that BMSC had the ability to differentiate into osteoblasts and adipoblasts. The least numbers of SPIO labeled BMSC detected by $T_1\text{WI}$, $T_2\text{WI}$, and $T_2^* \text{WI}$ were 2×10^4 , 1×10^4 , and 0.5×10^4 , respectively with low signal intensity.【Conclusions】BMSC can be effectively labeled by 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SPIO combined with 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PLL without influencing

收稿日期:2008-10-13

基金项目:国家自然科学基金(30670594,30770328);广东省科技厅科学事业费计划项目(2006B36003013)

作者简介:许杰华,在职博士生,E-mail:xujiehua@sysu.edu.cn; *通讯作者:单鸿,教授,E-mail:shanhong5@gmail.com

the cell viability, proliferation, cell cycle, apoptosis, and the multiple differentiation ability of labeled BMSC. 1.5T MRI tracking of SPIO labeled BMSC is feasible. Compared with T_1WI and T_2WI , T_2^*WI is the most sensitive sequence.

Key words: bone-derived mesenchymal stem cells; superparamagnetic iron oxide particles; magnetic resonance imaging; labeling

Friedenstein 等于 1974 年首次从骨髓中分离获得骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSC)。BMSC 在适宜的条件下能分化为心肌^[1]、骨、脂肪、软骨^[2]、肌腱、肌肉、神经元^[3]和肝细胞等, 具有无免疫排斥及无伦理道德问题等优点, 是细胞移植治疗各种器官、组织及细胞功能衰竭的理想种子细胞^[4,5]。但 BMSC 移植治疗应用于临床之前, 活体状态下动态监测植入体内 BMSC 的存活、迁移及分化是必须解决的一个重要问题。利用磁对比剂标记细胞进行 MR 成像是移植细胞定位及迁徙情况的重要监测手段^[6]。超顺磁性氧化铁 (superparamagnetic iron oxide, SPIO) 是细胞 MRI 显像的一种常用的对比剂。研究 SPIO 标记后细胞的生物学特性和多向分化能力是否受影响具有重要意义。目前国内外对 SPIO 标记后细胞生物学特性研究较多, 但对 SPIO 标记是否影响其多向分化潜能少有报道。本实验系统全面地探讨了 SPIO 标记 BMSC 后细胞的生物学特性、多向分化能力以及体外 MR 成像的可行性, 为干细胞移植活体 MR 成像奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠, 5 只, 雌雄不限, 体质量 70 克左右, 购自中山大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 DMEM-LG 培养基、胰酶 (美国 Gibco 公司), Percoll 细胞分离液 (Pharmacia), 胎牛血清 (PAA), 细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物), 地塞米松、维生素 C、吡哆美辛、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、胰岛素、四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、多聚赖氨酸 (PLL) (美国 Sigma 公司), 青霉素注射液、链霉素注射液 (Gibco), β -磷酸甘油 (Fluka), 超顺磁性氧化铁 (SPIO, 商品名 Resovist, Schering 公司), 油红 O (AMRESCO), 茜素红 (MBCHEM)。

1.1.3 主要仪器 倒置相差显微镜 (Olympus), CO_2 培养箱 (美国 Thermo 公司), 超净工作台 (苏

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2009, 30(2): 142-147, 164]

州净化), 离心沉淀机 (上海医用分析仪器厂), 1.5T MR (GE 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠 BMSC 分离、培养和鉴定 大鼠断颈处死, 体积分数 75% 酒精浸泡 20 min, 分离胫骨和股骨, 剪开骨两端关节面, 用生理盐水冲洗骨髓至骨髓变白, 用 2 mL 注射器将细胞吹散, 离心 (2 000 r/min, $r = 6.6$ cm, 15 min), 弃上清及脂肪层细胞, 沉淀加入 4 mL PBS, 充分混匀, 将细胞悬液缓慢层加到含有 4 mL Percoll 分离液 (比重为 1.077 g/mL) 的无菌离心试管中, 离心 (2 000 r/min, $r = 6.6$ cm, 20 min), 可见离心试管内液体分为 3 层, 收集中间层 (云雾层) 骨髓单个核细胞, 加入 4 mL PBS, 离心 (1 000 r/min, $r = 6.6$ cm, 10 min), 弃上清, 细胞入含体积分数为 100 mL/L 的胎牛血清的低糖 DMEM 培养液, 混悬细胞计数, 按 2×10^5 /mL 密度接种。置于 37 °C, 体积分数 5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养。24 h 后首次换液除去未贴壁细胞, 此后每 3 d 换液一次, 去除未贴壁细胞, 待细胞长到 80% ~ 90% 时, 进行传代。细胞传至第 3 代时, 收集 5×10^5 个细胞用流式细胞仪检 BMSC 的表面标志 CD29、CD45、CD44、CD11b, 并将细胞进行成骨、成脂诱导分化以鉴定干细胞。

1.2.2 BMSC 的 SPIO 标记 将铁浓度为 50 μ g/mL SPIO 和 1.5 μ g/mL 多聚赖氨酸加入无血清 DMEM 中, 室温振荡 60 min, 加等体积的 DMEM, 添加胎牛血清、表皮生长因子, 最后成为铁、多聚赖氨酸、胎牛血清和表皮生长因子的终浓度分别为 25 μ g/mL、0.75 μ g/mL、体积分数 10%、10 ng/mL 的混合液。将上述溶液加入吸掉培养基的第 3 代 MSC。37 °C, 体积分数 5% CO_2 条件下孵育 48 h。

1.2.3 标记细胞组织学分析、电镜观察和铁含量检测 于标记 48 h 进行, 并与未标记细胞对照。
① 标记率测定: 普鲁士蓝铁染色和核固红复染, 倒置显微镜下观察、拍照, 至少计数 700 个细胞, 统计铁染色阳性率, 重复 3 次。
② 细胞铁含量的检测: 高氯酸和硝酸 (体积比为 3:1) 充分消化细胞

及SPIO颗粒表面的葡聚糖,PBS稀释,邻菲罗啉分光光度计测量铁含量,除以细胞总数得每细胞含铁量。③电镜检测:标记BMSC制作超薄切片(70 μm),铀铅双染色,透射电镜观察并记录。

1.2.4 细胞生物学特性的检测 利用台盼蓝染色检测两组细胞活力;MTT法检测两组细胞生长曲线,反映增殖情况;流式细胞仪分析两组细胞周期、检测两组细胞凋亡(依照试剂盒说明书进行)。

1.2.5 成骨诱导 按60 000/每孔的细胞密度接种于胶原包被的24孔板,诱导液成分为地塞米松0.1 $\mu\text{mol/L}$, VitC 0.2 mmol/L, β 磷酸甘油钠10 mmol/L,含100 mL/L胎牛血清的DMEM-LG,诱导液每3 d换液1次,2周后进行茜素红染色。

1.2.6 成脂诱导 按60 000/每孔的细胞密度接种于胶原包被的24孔板,诱导液为地塞米松1 $\mu\text{mol/L}$,吡啶美辛100 $\mu\text{mol/L}$, IBMX 0.5 mmol/L,胰岛素10 mg/L,含100 mg/L胎牛血清的DMEM-LG,每2 d换液一次,成脂诱导10 d后,进行油红O染色,然后显微镜下观察。

1.2.7 SPIO标记对细胞生物学特性和多向分化能力的影响 取标记48 h BMSC组为实验组,以未标记BMSC为对照组。测量两组细胞的细胞活力、增殖、细胞周期、凋亡、成骨分化和成脂分化能力。

1.2.8 标记BMSC体外MR成像 利用1%琼脂糖溶液,制造一系列含同规格、圆锥形空洞的模型。分别将不同数量级(100×10^3 、 50×10^3 、 20×10^3 、 10×10^3 、 5×10^3 、 1×10^3)的SPIO标记BMSCs,均匀溶解在适量2%明胶溶液中,并植入圆锥形空洞,凝固,1%琼脂糖封闭。采用1.5T MR,表面线圈,内径12.7 cm;视野(FOV)20 cm \times 20 cm;层厚2 mm;矩阵384 \times 256。成像序列:①SE序列:T1WI,TR 400.00 ms,TE min full,Bandwidth 20.83, NEX 2.0。②快速自旋回波(FSE)序列:T₂WI,TR 3 000 ms,TE 102 ms,Bandwidth 21, NEX 3.0。③梯度回波序列(GRE):T₂*WI,TR 400 ms,TE 15.0 ms, Bandwidth 20.83, Flip Angle: 15, NEX 2.0。

1.2.9 数据统计和结果分析 所有数据用均数 \pm 标准差表示,标记细胞和未标记细胞间在

细胞活力、增殖、周期和凋亡的差异检验采用Student's *t*-test。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSC的培养、形态观察及鉴定

BMSC接种24 h后可见细胞贴壁生长,大量的造血干细胞悬浮在培养基中,为圆形细胞,贴壁细胞为三角形、多角形,并逐渐变成梭形,3~5 d增殖迅速,1周时出现致密的贴壁细胞层,长梭形,排列成放射状或旋涡状,呈集落样生长,约7~10 d长满培养皿。悬浮细胞随着换液次数增多逐渐被去掉,使BMSC得到纯化。用流式细胞仪测定第3代细胞表面标志,CD29(89.82%)、CD45(3.69%)、CD44(70.15%)、CD11b(2.93%)。诱导实验见贴壁细胞具有成骨、成脂分化能力。

2.2 细胞标记、组织学分析、电镜观察和铁含量检测

SPIO(25 $\mu\text{g Fe/mL}$)加PLL(0.75 $\mu\text{g/mL}$)标记24 h和48 h后,普鲁士兰染色(图1)显示铁染色阳性率分别为(91 ± 6.18)%和100%;电镜观察(图2)纳米颗粒分布在细胞质中的内含体,相对独立,与胞核和胞浆隔离;BMSC细胞总铁含量为(0.255 ± 0.24) pg/cell,标记SPIO(48 h)细胞总铁含量为(16.37 ± 3.10) pg/cell,是未标记细胞的64倍。

2.3 SPIO标记对细胞活力、增殖、周期和凋亡的影响

未标记细胞与标记细胞的细胞活力分别为(98.93 ± 0.98)%、(98.32 ± 0.43)%,两者差异无统计学意义;MTT值(第7天)分别为 0.28 ± 0.01 、 0.27 ± 0.02 ,两者差异无统计学意义($P > 0.05$);流式细胞分析仪检测细胞周期和细胞凋亡显示,未标记细胞和标记细胞分别有(88.1 ± 0.14)%、(88 ± 0.91)%的细胞处于G₀/G₁期,两者差异无统计学意义;未标记细胞和标记细胞的凋亡率分别为(6.24 ± 2.56)%、(7.1 ± 0.99)%,死亡率分别为(4.82 ± 1.89)%、(5.4 ± 1.84)%,两者差异无统计学意义。即,SPIO(25 $\mu\text{g Fe/mL}$,48 h)标记BMSC,对细胞的活力、增殖、周期和凋亡均无显著影响。

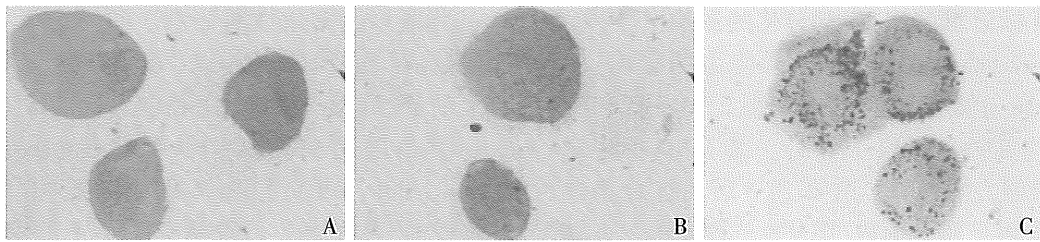


图 1 普鲁士兰染色显微图片

Fig.1 Photomicrographs of unlabeled and labeled with BMSC

A: unlabeled; B: 24 h; C: 48 h, ×1000

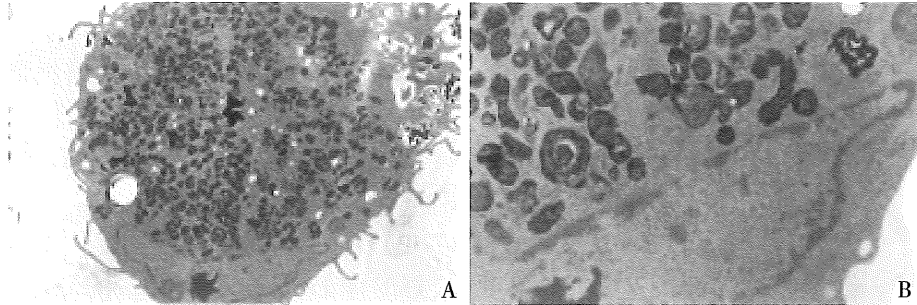


图 2 标记 SPIO(48 h)BMSC 扫描电镜图

Fig.2 Scanning electron micrographs of BMSC labeled with SPIO (25 μg Fe/mL, 48 h)

A: ×3900; B: ×11500

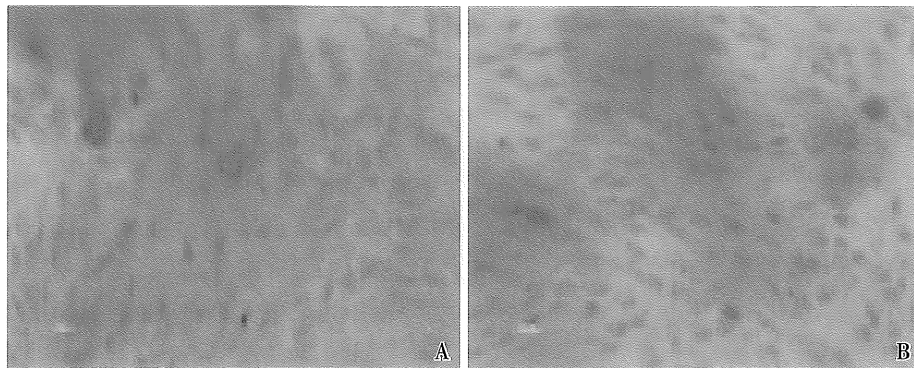


图 3 成骨分化: 未标记和标记 BMSC 茜素红染色

Fig.3 Osteogenic differentiation of unlabeled and labeled BMSC stained with alizarin red

A: unlabeled BMSC, B: labeled BMSC, ×200

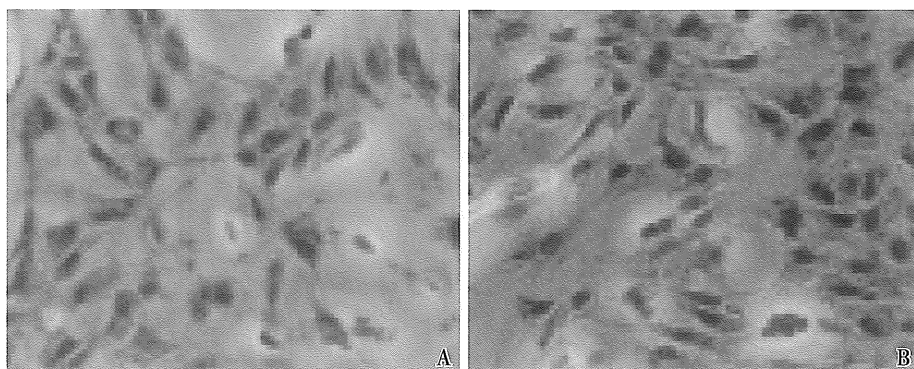


图 4 成脂分化: 未标记和标记 BMSC 油红 O 染色

Fig.4 Adipogenic differentiation of unlabeled and labeled BMSC stained with oil-red O with formation of lipid droplet in both

A: unlabeled BMSC; B: labeled BMSC; ×200

2.4 SPIO 标记对 MSC 多向分化的影响

① SPIO 标记对 BMSCs 成骨能力的影响, 标记后诱导 14 d 茜素红染色见未标记 BMSC 和标记 BMSC 均见钙盐沉积 (图 3)。② SPIO 标记对 BMSC 成脂能力的影响, 诱导 10 d 后油红 O 染色两组细胞均可见脂滴形成 (图 4)。

2.5 体外 MR 成像

分别对不同数量级标记 BMSC 行 MR T_1 WI、 T_2 WI、 T_2^* WI 扫描, 三种序列均见细胞信号降低, 随着细胞数目增多, 信号降低逐渐明显; 相同数量级细胞, T_1 WI 信号降低最弱, T_2^* WI 信号降低最明显; T_1 WI、 T_2 WI、 T_2^* WI 所能检测到的最小细胞数分别为 2×10^4 、 1×10^4 、 0.5×10^4 (图 5)。

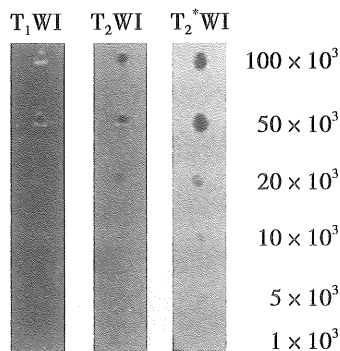


图 5 SPIO 标记 BMSCs 的 1.5T MR 成像

Fig.5 MR imaging of SPIO labeled BMSC ($25 \mu\text{g Fe}/\text{mL}$, 48 h) with 1.5T MR
Cell number was shown at the right side.

3 讨 论

BMSC 是再生医学重要的种子细胞, 没有固定的细胞表面标记。据其对塑料器皿的贴壁生长特性进行分离, 靠其多向分化能力进行鉴定。本研究联合 Percoll 法和贴壁法进行分离, 结果传代三次就可得到较纯的贴壁细胞, 流式细胞仪鉴定其较多表达 CD29 和 CD44, 较少表达 CD45、CD11b, 与文献报道一致^[7], 并且具备成骨、成脂多向分化能力。

细胞移植治疗的前提是移植细胞的活体监测。目前多种监测手段中最终可能应用于人体的移植细胞活体监测影像手段有核医学技术 (如 PET) 和磁共振两大类。磁粒子标记物主要有两类,

一类是 Gd^{3+} 顺磁性对比剂^[8], 主要产生 T_1 正性对比效应, 由于目前的 MR 条件下用于人体需要较大剂量, 可能产生毒性。目前对次此报道不多。另一类是以超顺磁氧化铁颗粒 (superparamagnetic iron oxide, SPIO) 为基础的对比剂, 在活体中 MRI 示踪神经、肝脏、心肌及肾脏等干细胞已取得了一定进展^[9-14], 是目前 MR 成像应用最广泛的对比剂。Frank 等^[15]研究表明, 直接 SPIO 标记效果差, 而采用 SPIO 联合转染剂 (如 PLL) 对细胞进行标记, 可大大提高 SPIO 的标记效果。目前 SPIO 用于干细胞标记的剂量报道不一, 一般认为剂量越大, 标记水平越高, 但同时可能影响干细胞的生物学性质, 因此, 选择合适的 SPIO 标记浓度意义重大。Arbab^[9]研究表明, $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ SPIO 标记不影响细胞的生物活性, 且可获得较好的标记效果, 而 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ SPIO 标记影响细胞生物活性。Walczak 等^[16]亦用 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ SPIO 标记细胞并成功进行 MR 成像。因此, 本研究小组采用 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ SPIO 联合 $0.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ PLL 进行 BMSC 标记, 结果表明: ① 该标记方法标记 48 h 可达到 100% 的标记率, 即可高效标记 BMSC。② 细胞内铁含量较高, 为未标记细胞内铁含量的 64 倍。

本研究证明, 与未标记细胞相比, 标记干细胞台盼蓝染色细胞活性和 MTT 测细胞增殖差异无统计学意义, 与文献报道结果一致^[9]。另外, 本研究用流式细胞仪对标记与未标记细胞进行细胞周期和凋亡检测, 结果显示标记干细胞的细胞周期和凋亡并没有改变, 进一步说明了适量 SPIO 标记不影响 BMSC 的生物学特性。SPIO 标记是否影响干细胞的多向分化能力是细胞移植治疗监测手段研究必须解决的关键问题。本实验室研究了该标记剂量下 BMSC 的成骨、成脂多向分化能力, 结果表明, $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ SPIO 联合 $0.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ PLL 干细胞标记同样具备成骨、成脂的多向分化能力, 说明该标记剂量并不影响 BMSC 的多向分化能力, 不改变‘干细胞’的特性。该研究为 SPIO 标记干细胞进行 MR 成像推向临床奠定了重要实验基础。

与低场 MR 相比, 高场 MR 具有较高的场强和更先进的应用软件, 可更敏感地进行磁标记干细胞活体成像, 但仅限于动物试验, 离临床应用尚有一定距离。Bos 等^[11]报道了利用 1.5T MR 监测

静脉注射 SPIO 标记细胞在大鼠肾脏和肝脏聚集的情况,为将 MR 活体监测磁标记细胞推向临床推进了一步。本研究利用 1.5T MR 对标记细胞进行离体成像,旨在为临床寻找磁标记细胞活体成像最佳条件。结果表明,细胞数目越多,MR 信号降低越明显,说明细胞数量与 MR 信号改变存在一定的联系,换言之,MR 信号改变程度可相对反映细胞数量多少。相同数量级细胞,肉眼观察显示 T_1WI 信号降低最弱, T_2^*WI 信号降低最明显,与文献报道一致^[17]。推测其原因是细胞标记后细胞内吞噬了大量的超顺磁性氧化铁,造成局部磁场的不均匀,加速了质子去相位的 T_2 弛豫,使组织信号降低,而对 T_1 影响较小。我们体外 MR 显像结果发现 1×10^4 个细胞可引起 T_2^*WI 信号明显降低,最敏感可发现 5×10^3 个细胞,与文献报道一致^[18]。该结果提示临床进行干细胞 MR 活体成像最好采用 1×10^4 个以上细胞数,并最好采用 T_2^*WI 序列。

本研究的创新点在于采用多种手段、多个方面地观察标记后细胞的生物学特性,并证明了该标记不影响其成脂、成骨多向分化能力。MR 成像仅进行体外实验,我们进一步的研究是进行动物实验 MR 成像。

总之, $25 \mu\text{g/mL}$ SPIO 联合 $0.75 \mu\text{g/mL}$ PLL 孵育 48 h 可高效标记 BMSCs。本研究通过多种手段证明了该标记浓度并不影响细胞活力、增殖、细胞周期和凋亡等生物特性,亦不影响 BMSCs 成骨、成脂多向分化能力,可进行 MR 成像, T_2^*WI 为 MR 成像的敏感序列。本研究为干细胞移植治疗的活体 MRI 成像奠定重要实验基础。

参考文献:

[1] 王彤,符岳,方向韶,等. 体外诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞的分化和鉴定 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2007,28(3S):9-11.

[2] 匡世军,张志光. 骨髓间充质干细胞在软骨组织工程的应用 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2006,27(4S):219-222.

[3] 姚晓黎,张成,刘卫彬,等. 成人骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞及与凋亡的关系 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2004,25(6):516-520.

[4] 潘兴华,贺斌,庞荣清,等. 猴脑血管缺血模型复制及骨髓间充质干细胞移植治疗 [J]. 热带医学杂志,

2006,6(5):533-536,532.

- [5] 傅明,梁海翔,何爱珊,等. 异体骨结合骨髓间充质干细胞移植治疗骨缺损的动物实验 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2007,28(5):515-519,572.
- [6] Bulte JW, Kraitchman DL. Monitoring cell therapy using iron oxide MR contrast agents [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2004,5(6):567-584.
- [7] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow [J]. *Blood*, 2001,98(8):2396-2402.
- [8] Shyu WC, Chen CP, Lin SZ, et al. Efficient tracking of non-iron-labeled mesenchymal stem cells with serial MRI in chronic stroke rats [J]. *Stroke*, 2007,38(2):367-374.
- [9] Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, et al. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging [J]. *Radiology*, 2003,229(3):838-846.
- [10] Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, et al. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques [J]. *Transplantation*, 2003,76(7):1123-1130.
- [11] Bos C, Delmas Y, Desmouliere A, et al. In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver [J]. *Radiology*, 2004,233(3):781-789.
- [12] Hauger O, Frost EE, van Heeswijk R, et al. MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy [J]. *Radiology*, 2006,238(1):200-210.
- [13] Arbab AS, Jordan EK, Wilson LB, et al. In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2004,15(4):351-360.
- [14] Daldrup-Link HE, Rudelius M, Piontek G, et al. Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment [J]. *Radiology*, 2005,234(1):197-205.
- [15] Frank JA, Miller BR, Arbab AS, et al. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents [J]. *Radiology*, 2003,228(2):480-487.
- [16] Walczak P, Kedziorek DA, Gilad AA, et al. Applicability and limitations of MR tracking of neural