

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.07.0841

· 论 著 ·

Fth1 基因标记对骨髓间充质干细胞生物学特性及体外 MRI 表现的影响

薛 杨¹, 黄晓蕾¹, 蔡伶俐¹, 王博成¹, 詹 青^{2*}, 赵江民^{1*}

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院影像科, 上海 201999

2. 上海中医药大学附属第七人民医院影像科, 上海 200137

[摘要] **目的** 观察铁蛋白报告基因 *Fth1* 标记对骨髓间充质干细胞(MSCs)生物学特性及体外 MRI 表现的影响。**方法** 原代分离培养大鼠 MSCs, 取第 4 代 MSCs, 用构建的携带铁蛋白重链基因 *Fth1* 的慢病毒载体进行感染, 并在培养液内加入 1 mol/L 柠檬酸铁进行培养。采用普鲁士蓝染色检测 MSCs 的摄铁能力, 锥虫蓝染色活细胞计数检测 MSCs 的细胞存活率, CCK-8 方法测定 MSCs 的增殖活性。应用 MRI 的 FSE T₂WI 和 SWAN 序列观察 *Fth1* 标记的 MSCs 和未标记 MSCs MRI 信号的差异。**结果** *Fth1* 基因可成功转染 MSCs, 转染 MSCs 的普鲁士蓝染色标记效率为 87%。未加含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs 细胞存活率为 (92.17±1.91)%, 细胞增殖活性 *D* 值为 1.094±0.068, 与未标记 MSCs 比较差异均无统计学意义[细胞存活率为 (94.23±2.42)%, 细胞增殖活性 *D* 值为 1.027±0.122; $P>0.05$]; 加入含铁培养液培养 3 d 后的 *Fth1* 标记 MSCs 细胞存活率为 (77.47±4.10)%, 细胞增殖活性 *D* 值为 0.493±0.024, 与未加含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs 及未标记 MSCs 比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。MRI 扫描 FSE T₂WI 和 SWAN 序列显示, 加入含铁培养液培养 5 d 后 *Fth1* 标记 MSCs 信号强度为 656.6±18.2, 与未加含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs 及未标记 MSCs 比较差异均有统计学意义 (分别为 807.3±17.1 和 847.1±10.5, $P<0.05$), 而未加含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs 与未标记 MSCs 比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** *Fth1* 报告基因可成功转染 MSCs, 转染后的 MSCs 可高效表达并摄取铁; 细胞活力及增殖活性在不含铁的培养液中不受影响, 但在铁浓度 1 mol/L 含铁培养液中受到一定影响; 经含铁培养液培养 5 d 后, MRI 可体外检测 *Fth1* 标记 MSCs, 其 FSE T₂WI 和 SWAN 序列呈低信号改变。

[关键词] 铁蛋白报告基因; 骨髓间充质干细胞; 生物学特性; 磁共振成像**[中图分类号]** R 445.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)07-0841-05

Effect of *Fth1* gene on biological characteristics and MRI feature of bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*

XUE Yang¹, HUANG Xiao-lei¹, CAI Ling-ling¹, WANG Bo-cheng¹, ZHAN Qing^{2*}, ZHAO Jiang-min^{1*}

1. Department of Medical Imaging, The Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201999, China

2. Department of Medical Imaging, The Seventh People's Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200137, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect ferritin reporter gene *Fth1* labeling on biological characteristics and magnetic resonance imaging (MRI) findings of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) *in vitro*. **Methods** Rat MSCs were isolated and cultured by plastic adherence method, and the lentiviral vectors carrying the ferritin heavy chain gene *Fth1* were constructed to transfect the 4th passage MSCs transfected with *Fth1*, and the MSCs were cultured in the medium added with 1 mol/L ferric citrate. Prussian blue staining was used to evaluate the iron uptake ability of the transfected MSCs, trypan blue staining was used to evaluate cell viability, and CCK-8 assay was used to evaluate the proliferation activity of transfected MSCs. The MRI

[收稿日期] 2016-03-13 **[接受日期]** 2016-05-04**[基金项目]** 上海市科委科技创新行动计划重点项目(10411953400), 上海交通大学医学院项目(12XJ30061), 上海市卫生局科研课题(20124194), 上海市宝山区科学技术委员会科研项目(14-E-4). Supported by Key Program of Technology and Innovation Action Plan of Shanghai Science and Technology Commission (10411953400), Project of Shanghai Jiaotong University School of Medicine (12XJ30061), Research Project of Shanghai Municipal Health Bureau (20124194), and Research Project of Science and Technology Commission, Baoshan District, Shanghai (14-E-4).**[作者简介]** 薛 杨, 硕士生. E-mail: xyang0520@163.com

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-58670561-6611, E-mail: zhanqing@tongji.edu.cn; Tel: 021-56692066, E-mail: johnmzhao@sjtu.edu.cn

signal differences between transfected MSCs and normal MSCs were observed by MRI FSE T₂WI and SWAN sequence.

Results MSCs were successfully transfected with *Fth1* gene, with the Prussian blue staining efficiency being 87%. For transfected MSCs without ferric citrate medium, the cell survival rate was (92.17±1.91)% and absorbance (*D*) value was 1.094±0.068, which were not significantly different from those of the normal MSCs ([94.23±2.42]% and 1.027±0.122, $P>0.05$). For transfected MSCs treated with ferric citrate medium for 3 days, the cell survival rate was (77.47±4.10)% and *D* value was 0.493±0.024, which were significantly different from those without ferric citrate treatment ($P<0.05$). The signal strength of MRI FSE T₂WI and SWAN sequence for transfected MSCs treated with ferric citrate medium was 656.6±18.2, which was significantly different from without ferric citrate treatment and the normal MSCs (807.3±17.1 and 847.1±10.5, $P<0.05$); and difference between without ferric citrate treatment and the normal MSCs was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** MSCs can be successfully transfected with *Fth1* reporter gene, and the transfected MSCs can efficiently overexpress and uptake iron. The cell viability and proliferation is not affected in ferric citrate free medium, but is affected when iron concentration is 1 mol/L. MRI can detect *in vitro* labeled MSCs after incubated in ferric citrate medium for 5 days, with FSE T₂WI and SWAN sequences showing low signal intensity.

[Key words] *Fth1*; mesenchymal stem cells; biological characteristics; magnetic resonance imaging

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(7): 841-845]

铁蛋白是普遍存在于动、植物和微生物体内的一种储铁蛋白,随着分子影像学的不断发展,铁蛋白基因作为一种报告基因被用于磁共振成像(MRI)^[1-3],并在细胞标记成像^[4]、基因治疗^[5]及药物筛选^[6]等方面得到广泛应用。近年来,利用干细胞治疗疾病成为研究热点,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)由于其自我更新、多向分化潜力,以及低免疫原性、供体来源充足的优点,成为研究干细胞治疗中的理想细胞类型。干细胞在体内的定位、迁移、存活及增殖等转归过程有赖于无创的影像学手段进行观察。关于MSCs的影像学示踪,目前研究最多的是超顺磁性氧化铁粒子^[7],它能够直接标记细胞,灵敏地产生信号,但缺点是随着细胞增殖分裂及生物降解作用细胞内的铁会逐渐稀释、消失。而报告基因则能够克服这一缺点,基因会遗传到子代细胞,继续表达相同的产物,保持细胞功能的持续性。在MRI检测中,铁蛋白报告基因通过增加细胞内铁含量,引起局部磁场分布不均匀,从而缩短T₂弛豫时间,产生T₂负性对比效应。本研究通过将铁蛋白报告基因*Fth1*转染MSCs,观察其对MSCs生物学特性的影响,并探讨体外MRI成像表现,为体内移植MSCs的MRI示踪提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 清洁级SD大鼠,4周龄,体质量60~80 g,雄性,购于第二军医大学实验动物中心[许可证号:SCXK(沪)2012-0003]。

DMEM/F12培养基(吉诺生物医药公司),胎牛血清(FBS, Gibco公司),*Fth1*慢病毒载体上清液(课题组前期构建),普鲁士蓝染色试剂盒(上海复申生物试剂公司),锥虫蓝染色试剂(Sigma公司),CCK-8试剂盒(Dojindo公司),荧光标记抗大鼠单抗PE-CD34、PE-CD44、FITC-CD90(BD公司),柠檬酸铁(Sigma公司)。倒置相差显微镜(Nikon公司),1.5 T MR成像仪(GE公司)。

1.2 大鼠MSCs体外分离、培养与鉴定 按照本课题组前期建立的方法^[8],通过全骨髓贴壁法提取原代SD大鼠MSCs,通过流式细胞仪检测表面抗原CD34、CD44及CD90,采用成骨、成脂肪诱导分化等方法对干细胞进行鉴定。取传代至第4代的MSCs进行后续实验。

1.3 *Fth1*报告基因转染MSCs 取状态良好的第4代MSCs,将培养液更换为*Fth1*慢病毒载体上清液,置于细胞培养箱(37℃、5% CO₂、湿度95%)孵育24 h。24 h后弃掉上清液,加入完全培养液培养,在倒置相差显微镜下观察细胞的形态及生长状况。将柠檬酸铁溶液与完全培养液混匀制成含铁培养液(柠檬酸铁浓度为1 mol/L),细胞转染2~3 d后更换为含铁培养液继续培养。更换含铁培养液3 d后,将细胞消化后铺于6孔板,待细胞贴壁后进行普鲁士蓝染色,显微镜下观察结果。细胞内有蓝色颗粒的为阳性细胞,计数各组3个低倍镜视野下的阳性细胞及细胞总数,计算阳性细胞标记率[阳性细胞标记率(%)=阳性细胞数/细胞总数×100%]。以

未转染 *Fth1* 基因的 MSCs 作为对照。

1.4 细胞活力和增殖活性的检测 将加入含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs、不加含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs 和未 *Fth1* 标记的 MSCs 培养 3 d 后分别制成细胞悬液,加 0.4% 锥虫蓝染液混匀,光镜下观察,染成蓝色的为死细胞,活细胞呈透明不着色。计数低倍镜下 3 个视野内活细胞和死细胞个数,计算细胞存活率[细胞存活率(%)=活细胞数/细胞总数 \times 100%]。实验重复 3 次。

将加入含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs、不加含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs 和未 *Fth1* 标记的 MSCs 培养 3 d 后分别制成细胞悬液,接种于 96 孔板(每孔 100 μ L,约 5 000 个细胞),每组设 10 个平行对照孔。在接种后第 3 天每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,培养箱孵育 2 h 后用酶联免疫检测仪测定 450 nm 处各孔的光密度(*D*)值,代表细胞增殖活性。实验重复 5 次。

1.5 *Fth1* 标记的 MSCs 体外 MRI 成像 将加入含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs、不加含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs 和未 *Fth1* 标记的 MSCs 培养 5 d 后分别制成细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔细胞量约 5×10^6 ,进行 MRI 扫描。采用 GE 1.5 T MR 成像仪,8 通道头颅线圈(Sense head 8 coil)。视野(FOV) 14.0 cm,层厚 1.0 mm,层间距 0 mm;采用

快速自旋回波序列 FSE T₂ 加权成像(TR 2 250 ms, TE 102 ms, Echo Train Length = 17 ms, Bandwidth 12.50),磁共振敏感加权成像 SWAN (TR 82.8 ms, TE 44.7 ms, Flip Angle 15°, Bandwidth 41.67)。测量各孔细胞悬液图像的信号强度,感兴趣区域(region of interest, ROI)为 20 mm²。实验重复 3 次。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,所测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,细胞存活率、细胞增殖活性及 MRI 信号强度比较采用 *t* 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 *Fth1* 转染 MSCs 形态观察 在倒置相差显微镜下观察发现,经 *Fth1* 转染后的 MSCs 少部分死亡细胞悬浮,余下贴壁细胞能够保持完整的梭形形态,与转染前形态无明显差别(图 1A)。更换含铁培养液后,细胞逐渐摄取铁进入胞内,3 d 后可以观察到部分悬浮的死细胞,贴壁细胞形态仍为梭形,光镜下可以看到细胞内棕黄色物质聚集(图 1B)。经胰酶消化离心后,可见沉积的细胞团块呈棕黄色(图 1C),而未加含铁培养液的转染 MSCs 及未转染 MSCs 离心后细胞团块呈白色(图 1D、1E)。

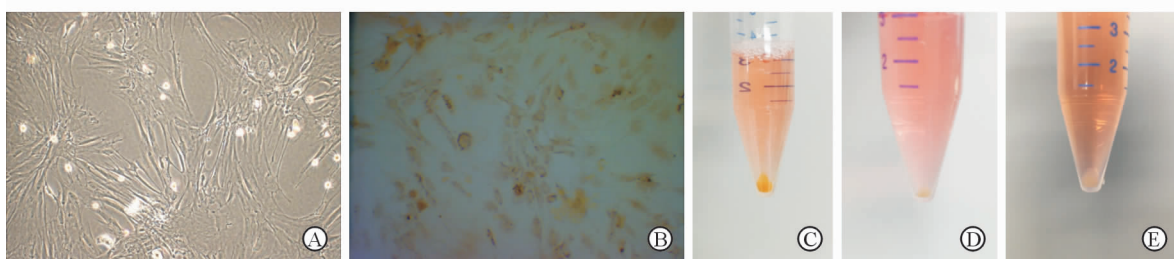


图 1 *Fth1* 转染 MSCs 加入含铁培养液前后的形态变化

Fig 1 Morphologic change of MSCs transfected with *Fth1* before and after adding iron

A; MSCs transfected with *Fth1*; B; MSCs transfected with *Fth1* 3 days after adding iron; C; MSCs cluster transfected with *Fth1* 3 days after adding iron; D; MSCs cluster transfected with *Fth1*; E; Normal MSCs cluster. MSCs; Mesenchymal stem cells. Original magnification: $\times 100$ (A, B)

2.2 *Fth1* 标记 MSCs 的效率 *Fth1* 转染 MSCs 3 d 后经普鲁士蓝染色,显微镜下观察到胞质内均出现聚集或散在分布的蓝色铁颗粒,细胞核周围明显(图 2),对照组细胞内则没有蓝色物质。*Fth1* 转染 MSCs 阳性细胞标记率为 87%。

2.3 细胞活力和增殖活性的变化 活细胞计数结

果显示,未 *Fth1* 标记的 MSCs 细胞存活率为 $(94.23 \pm 2.42)\%$ 、细胞增殖活性 *D* 值为 1.027 ± 0.122 ,不加含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs 细胞存活率为 $(92.17 \pm 1.91)\%$ 、细胞增殖活性 *D* 值为 1.094 ± 0.068 ,两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);加入含铁培养液 3 d 后的 *Fth1* 标记 MSCs

细胞存活率为(77.47±4.10)%、细胞增殖活性 D 值为0.493±0.024,与未 *Fth1* 标记的 MSCs 及不加含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs 比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。说明含铁培养对 *Fth1* 标记的 MSCs 活细胞有抑制作用。

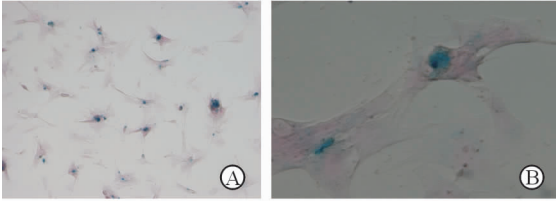


图2 *Fth1* 转染 MSCs 3 d 后普鲁士蓝染色
Fig 2 Prussian blue staining of MSCs 3 days after transfection with *Fth1*

MSCs: Mesenchymal stem cells. Original magnification: ×100 (A), ×400 (B)

2.4 *Fth1* 标记 MSCs 体外 MRI 成像 MRI 扫描结果(图 3)显示,未加含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs 在 FSE T_2 WI、SWAN 序列信号与未 *Fth1* 标记 MSCs 相近,信号强度分别为 807.3 ± 17.1 和 847.1 ± 10.5 ,差异无统计学意义($P>0.05$);加入含铁培养液培养 5 d 的 *Fth1* 标记 MSCs 呈低信号,信号强度为 656.6 ± 18.2 ,与未加含铁培养液的 *Fth1* 标记 MSCs 及未 *Fth1* 标记 MSCs 比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

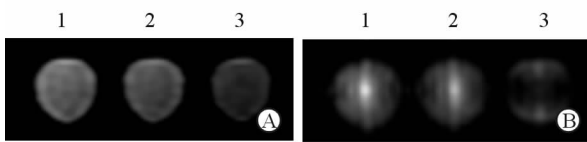


图3 *Fth1* 转染 MSCs 加入含铁培养液培养 5 d 后 MRI 扫描结果
Fig 3 MRI scan of *Fth1* transfected MSCs 5 days after iron addition

A: FSE T_2 WI sequence; B: SWAN sequence. 1: Normal MSCs; 2: MSCs transfected with *Fth1*; 3: MSCs transfected with *Fth1* 5 days after adding iron. MSCs: Mesenchymal stem cells

3 讨论

MRI 具有良好的软组织分辨率,既能够精确显示组织解剖结构,又能进行物质代谢测定等功能成像。铁蛋白报告基因是 MRI 报告基因的一种,过表达的产物铁蛋白能够调节细胞内外铁浓度,使细胞摄取外环境的铁,升高细胞内铁浓度,从而缩短 T_2 弛豫时间,产生 T_2 负性对比效应,并且在体检测不

需要引入外源性对比剂。因此,铁蛋白可作为一种较为理想的 MRI 内源性对比剂。铁蛋白分子由蛋白壳和中心的铁核构成,蛋白壳是由 24 个亚基组成的球形空腔结构,其亚基包括重链(H 链)和轻链(L 链)两种形式,H 链具有亚铁氧化酶的活性,可以促进铁结合,将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} [9],而 L 链在维持铁蛋白的稳定性上起着关键作用。

早期研究中,Cohen 等[10]构建了鼠铁蛋白 H 链的病毒载体,并转染胶质瘤 C6 细胞,通过体内外 MRI 观察到过表达铁蛋白 H 链的 C6 细胞 T_2 值较未转染的细胞明显降低,同时组织学方法证明了细胞内铁蛋白 H 链表达和铁的增加。Liu 等[11]建立了携带人铁蛋白 H 链基因的小鼠胚胎干细胞系,MRI 扫描发现与野生干细胞移植瘤相比,移植入体内的过表达铁蛋白 H 链的转基因胚胎干细胞移植瘤 T_2 弛豫时间明显降低,移植后 14 d 横向弛豫率 R_2 增加 15%,移植后 21 d R_2 增加 28%,并通过病理证实细胞内铁的存在。本研究构建了大鼠来源铁蛋白 H 链基因慢病毒载体,将 *Fth1* 基因成功转染大鼠 MSCs。将转染 MSCs 在柠檬酸铁浓度为 1 mol/L 的含铁培养液中培养 5 d 后进行 MRI 扫描, T_2 WI 及 SWAN 序列都能产生明显的信号降低,普鲁士蓝染色也证明了细胞内铁的存在。因此,我们认为通过慢病毒载体携带 *Fth1* 基因可标记 MSCs,并能够通过 MRI 检测到 *Fth1* 基因标记的 MSCs。在预实验中我们在转染 MSCs 后 48 h 进行 MRI 扫描,未检测到信号的降低;而将 MRI 扫描时间延迟到 5 d 后,便能检测到明显低信号。提示随着时间延长,*Fth1* 基因表达量也在不断增加,这与 Liu 等[11]研究结果符合。然而,信号强度是否会随时间持续增强,有待进一步研究。

有研究发现,细胞内的自由铁会增强过氧化物的代谢,形成过多的自由基,导致细胞膜、蛋白和 DNA 的损害[12]。通过转染铁蛋白基因的干细胞,由于铁蛋白的过表达会使细胞摄取过量的铁,细胞内过量的铁对细胞的生物学特性是否有影响值得探究。本研究将慢病毒转染后的 MSCs 与未转染 MSCs 进行锥虫蓝染色和 CCK-8 检测,结果显示转染组的细胞活力和增殖活性与未转染组比较差异没有统计学意义,说明 *Fth1* 慢病毒载体不会影响细胞的生物学特性。这与 Kim 等[13]的研究结果一致。本研究对 *Fth1* 转染 MSCs 加入含铁培养液培养 3 d 后再次检测细胞活力和增殖活性,结果显示其细胞活力和增殖活性均降低,表明 *Fth1* 转染 MSCs 在富铁环境中培养,其活力和增殖能力受到一定影响。

Naumova 等^[14]将转染铁蛋白基因的细胞和未转染的细胞同时加入铁培养液,结果表明在富铁环境下转染铁蛋白基因的细胞活性强于未转染细胞。原因可能在于铁蛋白基因的过表达能够将细胞内游离的 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} ,使细胞更好地螯合摄入的铁,减少游离的 Fe^{2+} 参与自由基的生成过程,降低对细胞的损害。本研究中含铁培养液中柠檬酸铁的浓度为 1 mol/L,对细胞活力和增殖活性有一定影响,前期预实验中尝试 0.1、0.5 mol/L 等浓度,但经普鲁士蓝染色检测细胞摄铁量比较低。因此,培养液铁浓度、加入含铁培养液的培养时间都会影响细胞摄铁量,在既不影响细胞增殖活性,又能使细胞携带足够的铁被检测出来的前提下摸索一个合适的浓度,有待进一步探究。

本研究通过慢病毒载体成功将 *Fth1* 基因转染大鼠 MSCs,并通过普鲁士蓝染色证实了细胞的摄铁能力,在普通培养液中 *Fth1* 基因不影响 MSCs 的生物学活性,但在含铁培养液中培养对其活性有一定影响。MRI 能够对 *Fth1* 标记 MSCs 进行示踪。本研究不足之处在于只将 *Fth1* 转染 MSCs 后进行 MRI 扫描时间延长到 5 d,随着时间推移其低信号强度是否会持续增强或保持不变,需要进一步延长检测时间进行探索。此外,本研究为体外实验,生物干扰性较少,在体研究时由于稀释作用或者体内铁环境的浓度限制,*Fth1* 转染干细胞的 MRI 信号能否被检测到,以及在体 MRI 示踪时间窗有多长,仍需要体内实验进一步探究。

[参考文献]

[1] PEREIRA S M, MOSS D, WILLIAMS S R, MURRAY P, TAYLOR A. Overexpression of the MRI reporter genes ferritin and transferrin receptor affect iron homeostasis and produce limited contrast in mesenchymal stem cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 15481-15496.

[2] KIM H S, CHO H R, CHOI S H, WOO J S, MOON W K. *In vivo* imaging of tumor transduced with bimodal lentiviral vector encoding human ferritin and green fluorescent protein on a 1.5T clinical magnetic resonance scanner[J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 7315-7324.

[3] HE X, CAI J, LIU B, ZHONG Y, QIN Y. Cellular magnetic resonance imaging contrast generated by the ferritin heavy chain genetic reporter under the control of a Tet-On switch[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 207.

[4] CAMPAN M, LIONETTI V, AQUARO G D,

FORINI F, MATTEUCCI M, VANNUCCI L, et al. Ferritin as a reporter gene for *in vivo* tracking of stem cells by 1.5-T cardiac MRI in a rat model of myocardial infarction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300: H2238-H2250.

[5] BERBERAT P O, KATORI M, KACZMAREK E, ANSELMO D, LASSMAN C, KE B, et al. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury[J]. *FASEB J*, 2003, 17: 1724-1726.

[6] COHEN B, ZIV K, PLAGS V, ISRAELY T, KALCHENKO V, HARMELIN A, et al. MRI detection of transcriptional regulation of gene expression in transgenic mice[J]. *Nat Med*, 2007, 13: 498-503.

[7] HUANG Z, LI C, YANG S, XU J, SHEN Y, XIE X, et al. Magnetic resonance hypointensive signal primarily originates from extracellular iron particles in the long-term tracking of mesenchymal stem cells transplanted in the infarcted myocardium[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 1679-1690.

[8] 刘 佳,赵江民,张 蕾,何 瑶,杨 嘉.超顺磁性氧化铁标记大鼠骨髓间充质干细胞的研究[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2010, 31: 30-35.

[9] TREFFRY A, ZHAO Z, QUAIL M A, GUEST J R, HARRISON P M. Dinuclear center of ferritin: studies of iron binding and oxidation show differences in the two iron sites[J]. *Biochemistry*, 1997, 36: 432-441.

[10] COHEN B, ZIV K, PLAGS V, ISRAELY T, KALCHENKO V, HARMELIN A, et al. MRI detection of transcriptional regulation of gene expression in transgenic mice[J]. *Nat Med*, 2007, 13: 498-503.

[11] LIU J, CHENG E C, LONG R C, YANG S H, WANG L, CHENG P H, et al. Noninvasive monitoring of embryonic stem cells *in vivo* with MRI transgene reporter[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2009, 15: 739-747.

[12] EMERIT J, BEAUMONT C, TRIVIN F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury[J]. *Biomed Pharmacother*, 2001, 55: 333-339.

[13] KIM H S, WOO J, LEE J H, JOO H J, CHOI Y, KIM H, et al. *In vivo* tracking of dendritic cell using MRI reporter gene, ferritin[J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0125291.

[14] NAUMOVA A V, REINECKE H, YARNYKH V, DEEM J, YUAN C, MURRY C E. Ferritin overexpression for noninvasive magnetic resonance imaging-based tracking of stem cells transplanted into the heart[J]. *Mol Imaging*, 2010, 9: 201-210.